



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALLYSON LEANDRO RODRIGUES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE SORVENTE MONOLÍTICO DE POLI(TMPTA-
co-EDMA-co-MAA) IMPRESSO MOLECULARMENTE PARA
EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL DE NITROSAMINAS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

ITUIUTABA

2024

ALLYSON LEANDRO RODRIGUES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE SORVENTE MONOLÍTICO DE POLI(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) IMPRESSO MOLECULARMENTE PARA EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL DE NITROSAMINAS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S237 2024	Santos, Allyson Leandro Rodrigues dos, 1995- Desenvolvimento de sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente para extração em ponteira descartável de nitrosaminas em formulações farmacêuticas [recurso eletrônico] / Allyson Leandro Rodrigues dos Santos. - 2024. Orientador: Anizio Marcio de Faria . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.176 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. , Anizio Marcio de Faria,1977-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título. CDU: 54
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 156, PPGQUI				
Data:	Vinte e três de fevereiro de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	13h30	Hora de encerramento:	17h50
Matrícula do Discente:	11913QMI009				
Nome do Discente:	Allyson Leandro Rodrigues dos Santos				
Título do Trabalho:	“Desenvolvimento de sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente para extração em ponteira descartável de nitrosaminas em formulações farmacêuticas”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Desenvolvimento de sorventes monolíticos poliméricos na ponteira descartável de micropipeta”				
<u>ODS</u>	ODS 3 - Saúde e bem-estar e ODS 13 - Ação contra a mudança global do clima				

Reuniu-se, por webconferência, no *link*: <https://meet.google.com/wxz-kvca-swf>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Eduardo Mathias Richter**, da Universidade Federal de Uberlândia; **Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz**, Universidade Federal de Uberlândia; **Carla Beatriz Grespan Bottoli**, Universidade de Campinas - UNICAMP; **Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz**, da Universidade Federal de Viçosa; e **Anizio Marcio de Faria**, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, **Dr. Anizio Marcio de Faria**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Anizio Marcio De Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2024, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2024, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2024, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Beatriz Grespan Bottoli, Usuário Externo**, em 23/02/2024, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, Usuário Externo**, em 23/02/2024, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5053265** e o código CRC **F6FF53AD**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria das Dores e Jorge, meus irmãos Fabricio e Georgiany, e ao Dr. Anizio Marcio de Faria por toda confiança e pelos ensinamentos que fazem de mim o que sou hoje. E aos meus pequenos Tiago, Valentina e Murilo e Yolanda que fazem com que eu sempre tenha motivos para seguir a diante. A vocês, com muito amor, expresso o meu eterno agradecimento!

Dedico !

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por toda força, sabedoria e coragem para que eu pudesse seguir todos os meus sonhos de acordo com os seus planos. Meu eterno agradecimento.

Aos meus pais Maria das Dores e Jorge por todo incentivo e confiança, por terem acreditado e sempre torcerem pelas minhas conquistas diárias. A todos os meus familiares que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui, em especial meus irmãos, e cunhada Sirlei e minhas primas Andreia, Adriana, Anna e Bruna que, mesmo com a distância não deixaram de me apoiar. E de forma muito especial os meus sobrinhos que a cada “Eu Te amo” fazem o meu dia mais feliz.

Ao Dr. Anizio Marcio de Faria, por toda dedicação em promover e compartilhar seu conhecimento e pela amizade construída nesses anos. Meu eterno agradecimento pela oportunidade, você é o meu exemplo de pessoa e profissional.

Aos demais professores do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal – ICENP, em especial os professores André Santos, Elaine, Flash, Regina, Renata, Rodrigo e Rosana por todas as discussões realizadas durante esse período que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, vocês sempre serão inspirações para mim. Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFU pela oportunidade e espaço concedido.

A prof. Dra. Carla Beatriz G. Bottoli por ter me recebido em seu laboratório, NovaCrom IQ/UNICAMP, para um período de muito aprendizado profissional e pessoal, me proporcionando experiências únicas durante o meu crescimento, a você o meu Muito Obrigado. Também um agradecimento especial a técnica do laboratório Me. Lucilia, que me auxiliou e apoiou durante a minha estada no IQ/UNICAMP, “Lú” você é uma mulher incrível e um exemplo de profissional a ser seguido. Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNICAMP pela oportunidade e espaço concedido.

Aos meus companheiros de casa, os que já passaram e aos que estão. Em especial ao Alan, Mariana, Thaís, Jessyka, Cinthia, Andressa, Mira, Ana Julia, Rafaela, Poliana, Vitor e Rosana que foram essenciais nessa caminhada, fortalecendo os laços que nos unem como família.

Aos meus companheiros de grupo, CroMat, agradeço a confiança, incentivo e por todo aprendizado adquirido. Um agradecimento especial ao Marcos minha eterna dupla de vida pessoal e profissional, ao Henrique que chegou a pouco, mas já se faz tão constante na minha vida, e falando de pessoas recentes, mas de extrema importância, não poderia de agradecer ao Eliezer, o “Eli”, você foi Luz no meu caminho, muito obrigado por toda ajuda e amizade, Amo muito vocês. Aos amigos de caminhada que a UFU e a UNICAMP me deram, Diele, Adrielly, Lorena, Lauro, Giselle, Isabela, Kátia,

Maria Fernanda, Amanda, João Pedro, Nicoli, Maria Clara, Roberta, Laís, Leticia, Ana Clara, Naiara, Carol, Luiz, Mayara, Mateus, Paulo, Guilherme, Rafaela, Mayara, Evelyn, Cynthia, Leonardo, Vitoria, Renato, Bianca, Bianquinha, Ananda, Daiane, Igor, Gisláine, Hery, Carlos e tantos entre muitos outros que são tão importantes e valiosos para mim quanto os citados, porque sempre estiveram ao meu lado nos momentos de decepção e frustrações me ajudando a superá-los, mas também em inúmeros momentos de alegria que compartilhamos. A cada um de vocês a minha gratidão.

Agradeço às agências de fomento que viabilizaram a realização do doutorado: ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida; à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento da infraestrutura laboratorial (código: 01.11.0135.00) e de equipamentos (código: 01.13.0371.00) empregados na pesquisa; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo financiamento do projeto (APQ-01901-22).

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente no desenvolvimento desse trabalho e no meu crescimento profissional.

*"A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros; só é preciso se
lembrar de acender a luz"*

(Passagem do Livro "Harry Potter" de J. K. Rowling)

*"Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei em
ombros de gigantes"*

Isaac Newton.

RESUMO

Métodos de preparo de amostras rápidos, ecologicamente corretos e portáteis na análise química tem sido amplamente almejados. Um método que tem recebido atenção é a extração em ponteira descartável (DPX), na qual um sorvente particulado é disperso dentro de uma ponteira, retido por filtros de Teflon. No entanto, dois fatores ainda limitam maiores aplicações da DPX (i) baixa disponibilidade de sorventes, limitando a sua seletividade e (ii) a pressão necessária na sucção e dispensa de líquidos devido à resistência provocada pelos filtros de Teflon. A proposta deste trabalho é tornar a DPX totalmente portátil e seletiva, preparando e funcionalizando monolitos poliméricos macroporosos dentro de ponteiras descartáveis. Assim, foi realizada a termo polimerização *in situ* de triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA), ácido metacrílico (MAA) e dimetacrilato de etilenoglicol (EDMA), utilizando 2,2-azobisisobutironitrila como iniciador radicalar e polietilenoglicol (PEG) e isopropanol como porogênicos a 60 °C por 20 h. A funcionalização do monolito ocorreu via impressão molecular (MIP) de N-nitrosodimetilamina (NDMA). A preparação do sorvente monolítico foi otimizada, avaliando as razões molares de TMPTA:EDMA, de monômero:solvente porogênico e de MAA:NDMA, e solventes porogênicos, monitorando o fluxo de líquidos através dos monolitos. Os monolitos moldados na ponteira com 100 µL da mistura monomérica apresentaram como condição ótima de preparação: isopropanol e PEG como solventes porogênicos, razão TMPTA:EDMA:MAA:porogênico (4%:14%:2%:80%). Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impressos molecularmente com NDMA apresentaram uma estrutura sólida globular com longos canais interconectados, macroporosidade > 60 % e área superficial específica de até 81 m² g⁻¹, resultando em vazões de líquido de 1,24 mL min⁻¹. A impressão molecular do NDMA foi otimizada na razão molar de 1,28 mmols:1 mol de MAA:NDMA, com fator de impressão de 3,75. O monolito poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impressos com NDMA foram otimizados para a extração DPX em fluxo do NDMA de amostras aquosas de formulações farmacêuticas, estabelecendo como condições ótimas 2,0 mL de amostra em ciclo único e eluição com 500 µL de acetonitrila em dois ciclos. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). O método DPX proposto resultou em uma extração em fluxo do NDMA de 70 %, com fator de concentração de 4x e limite de quantificação de 1,71 ng mL⁻¹. Desta forma, o método DPX com poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso com NDMA opera no modo de extração em fluxo e pode ser considerado simples, seletivo ao NDMA, de boa detectabilidade, econômico e totalmente portátil, se tornando uma alternativa na determinação do contaminante em formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Fast, environmentally friendly and portable sample preparation methods for chemical analysis have been widely sought after. One method that has received attention is disposable tip extraction (DPX), in which a particulate sorbent is dispersed inside a tip, retained by Teflon filters. However, two factors still limit further applications of DPX (i) low availability of sorbents, limiting its selectivity and (ii) the pressure required for suction and dispensing of liquids due to the resistance caused by the Teflon filters. The aim of this work is to make DPX fully portable and selective by preparing and functionalizing macroporous polymer monoliths inside disposable tips. Thus, in situ thermo-polymerization of trimethylolpropane triacrylate (TMPTA), methacrylic acid (MAA) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) was carried out using 2,2-azobisisobutyronitrile as a radical initiator and polyethylene glycol (PEG) and isopropanol as porogens at 60 °C for 20 hours. The monolith was functionalized via molecular imprinting (MIP) of N-nitrosodimethylamine (NDMA). The preparation of the monolithic sorbent was optimized by evaluating the molar ratios of TMPTA:EDMA, monomer:porogenic solvent and MAA:NDMA, and porogenic solvents, monitoring the flow of liquids through the monoliths. The monoliths molded on the tip with 100 μL of the monomer mixture had the following optimum preparation conditions: isopropanol and PEG as porogenic solvents, TMPTA:EDMA:MAA:porogenic ratio (4%:14%:2%:80%). The poly(TMPTA-co-MAA-co-EDMA) monoliths molecularly imprinted with NDMA showed a globular solid structure with long interconnected channels, macroporosity > 60 % and a specific surface area of up to 81 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, resulting in liquid flow rates of 1.24 mL min^{-1} . The molecular printing of NDMA was optimized at a molar ratio of 1,28 mmols:1 mol of MAA:NDMA, with a imprinting factor of 3.75. The poly(TMPTA-co-MAA-co-EDMA) monoliths imprinted with NDMA were optimized for the DPX flow extraction of NDMA from aqueous samples of pharmaceutical formulations, establishing as optimum conditions 2.0 mL of sample in a single cycle and elution with 500 μL of acetonitrile in two cycles. The extracts obtained were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The proposed DPX method resulted in a flow extraction of NDMA of 70%, with a concentration factor of 4x and a quantification limit of 1.71 ng mL^{-1} . Thus, the DPX method with poly(TMPTA-co-MAA-co-EDMA) imprinted with NDMA operates in flow extraction mode and can be considered simple, selective to NDMA, with good detectability, economical and totally portable, making it an alternative for determining the contaminant in pharmaceutical formulations.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	<i>Atomic force microscopy</i> (microscopia de força atômica)
AIBN	<i>2,2'-azobisisobutyronitrile</i> (2,2'-azobisisobutironitrila)
API	<i>Active Pharmaceutical ingredient</i> (ingrediente farmacêutico ativo)
BET	<i>Brunauer-Emmett-Teller</i>
BJH	<i>Barrett-Joyner-Halenda</i>
C18	Octadecilsilano
CR	<i>Congo red</i> (vermelho do Congo)
DIPNA	<i>N-nitrosodiisopropylamine</i> (N-nitrosodiisopropilamina)
DPX	<i>Disposable pipette extraction</i> (Extração em ponteira descartável)
EDMA	<i>Ethylene Glycol Dimethacrylate</i> (Dimetacrilato de etilenoglicol)
EIPNA	<i>Ethylisopropyl nitrosamine</i> (Etilisopropilnitrosamina)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
FC	Fator de concentração
FTIR	<i>Fourier-transform infrared Spectroscopy</i> (espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier)
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano)
IF	<i>Imprinting factor</i> (fator de impressão molecular)
IS	<i>Internal standard</i> (padrão interno)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (Extração líquido-líquido)
LoQ	<i>Limit of quantification</i> (limite de quantificação)
LoQ _{inst}	Limite de quantificação do instrumento
LoQ _{met}	Limite de quantificação do método
MAA	<i>Methacrylic acid</i> (Ácido metacrílico)
MeOH	Metanol
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> (Polímeros de impressão molecular)
MNP	<i>N-nitroso-N'-methylpiperazine</i> (N-nitroso-N'-metilpiperazina)

NDEA	<i>N-nitrosodiethylamine</i> (N-nitrosodietilamina)
NDMA	<i>N-nitrosodimethylamine</i> (N-nitrosodimetilamina)
NMBA	<i>N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid</i> (Ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico)
NMPA	<i>Methylphenylnitrosamine</i> (Metilfenilnitrosamina)
PEG	<i>Polyethylene glycol</i> (Poli(etileno glicol))
Poli(TMPTA-co-EDMA)	Sorvente DPX monolítico termicamente copolimerizado por triacrilato de trimetilolpropano e dimetacrilato de etilenoglicol
Poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	Sorvente DPX monolítico termicamente copolimerizado por triacrilato de trimetilolpropano, dimetacrilato de etilenoglicol e ácido metacrílico
RSD	<i>Relative standard deviation</i> (desvio padrão relativo)
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i> (Extração em barra de agitação sortiva)
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> (microscopia eletrônica de varredura)
SIM	<i>Selected ion monitoring</i> (monitoramento de íon selecionado)
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> (Microextração em fase sólida)
TEOS	<i>Tetraethoxysilane</i> (tetraetoxissilano)
TG	<i>Thermogravimetric analysis</i> (análise termogravimétrica)
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> (cromatograma de íons totais)
TMOS	<i>Tetramethoxysilane</i> (tetrametoxissilano)
TMPTA	<i>Trimethylolpropane triacrylate</i> (Triacrilato de trimetilolpropano)
UV	<i>Ultraviolet radiation</i> (radiação ultravioleta)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas das principais N-nitrosaminas encontradas em medicamentos.	21
Tabela 2. Principais monômeros utilizados na preparação de polímeros impressos molecularmente.	35
Tabela 3. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando polietilenoglicol 1000 e metanol como agentes porogênicos.	46
Tabela 4. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando polietilenoglicol e isopropanol como agentes porogênicos.	47
Tabela 5. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando PEG na forma de solução metanólica a 10 % (m/v) e isopropanol como agentes porogênicos.....	47
Tabela 6. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando uma solução 10 % (m/v) de polietilenoglicol ou isopropanol como agente porogênico.	48
Tabela 7. Condições experimentais para impressão molecular de vermelho do Congo no monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado.	49
Tabela 8. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) obtidos nas reações #13 e #14.....	58
Tabela 9. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) #18.	59
Tabela 10. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #18 após extração Soxhlet.	60
Tabela 11. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #20 e #21.	60
Tabela 12. Medidas da vazão de solventes (água) pelos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.	63
Tabela 13. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.....	67
Tabela 14. Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos, utilizando o método de saturação de fluidos, utilizando o seis pontos iniciais.	70
Tabela 15. Densidades reais para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.....	72
Tabela 16. Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) impressos molecularmente com vermelho do Congo, utilizando o método de saturação de fluidos e o butanol como solvente. n = 3.	74
Tabela 17. Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich para a adsorção de vermelho do Congo nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP e MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5.	78

Tabela 18. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA), utilizando uma solução metanólica de 10 % (m/v) de PEG e isopropanol como solventes porogênicos.....	82
Tabela 19. Condições para impressão molecular da NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).....	83
Tabela 20. Parâmetros estudados na otimização do método DPX empregando o sorvente monolítico poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) na extração de NDMA de amostras líquidas.....	84
Tabela 21. Taxas de recuperação de NDMA de amostras aquosas em três níveis de fortificação e em três dias distintos, empregando o método DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co- EDMA-co-MAA).	104
Tabela 22. Recuperação de NDMA de diferentes formulações farmacêuticas, empregando o método DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação geral da formação de uma N-nitrosamina.	22
Figura 2. Estruturas químicas de insumos farmacêuticos ativos em medicamentos que apresentaram NDMA. Valsartana (A), losartana (B), irbesartana (C), ranitidina (D), metformina (E) e nizatidina (F).	24
Figura 3. Esquema da ponteira DPX comercial.	27
Figura 4. Esquema da mistura dinâmica entre amostra/solvente e sorvente na DPX.	28
Figura 5. Esquema representativo das etapas de extração de um processo DPX completo.	29
Figura 6. Esquema da formação de um MIP.	36
Figura 7. Esquema do pré-tratamento ácido e vedação da extremidade inferior das ponteiras de micropipeta de 1000 μ L.	43
Figura 8. Reagentes utilizados para a preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA). (A) AIBN, (B) EDMA, (C) IsopOH, (D) MeOH, (E) PEG em que m é o número de unidades etilenoglicólicas, e (F) TMPTA.	44
Figura 9. Fluxograma do processo de preparação do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA).	45
Figura 10. Estrutura química do corante vermelho do Congo.	48
Figura 11. Micrografias dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #1 (A), #2 (B) e #3 (C), com ampliação de 10 kx.	55
Figura 12. Micrografias dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) #4 (A) e #5 (B), com ampliação de 10 kx.	56
Figura 13. Micrografias dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #8 (A) e #9 (B), com ampliação de 10 kx.	57
Figura 14. Fotografia do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26.	62
Figura 15. Reação de polimerização <i>in situ</i> do TMPTA e EDMA dentro da ponteira de micropipeta.	63
Figura 16. Espectros FTIR dos (A) monômeros TMPTA e EDMA e (B) monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28.	64
Figura 17. Micrografias eletrônicas de varredura dos monolitos (A) poli(TMPTA-co-EDMA) #26 (PEG + isopropanol), (B) #27 (isopropanol) e (C) #28 (PEG).	65
Figura 18. Micrografias AFM 3D dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparado com diferentes porogênicos, (A) #26 (sol. PEG 10 % e isopropanol) e (B) #27 (isopropanol).	66
Figura 19. Isotermas de adsorção de N ₂ para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos: #26 (PEG + isopropanol), #27 (isopropanol) e #28 (PEG).	68
Figura 20. Perfil gravimétrico da macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos obtido pelo método de saturação de fluidos.	69
Figura 21. Curvas TG para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos. Faixa de temperatura de 25 a 600 °C a com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	71

Figura 22. Perfil gravimétrico da macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado e impresso molecularmente com vermelho do Congo pelo método de saturação de fluidos.	73
Figura 23. Curva analítica do vermelho do Congo em soluções aquosas.	75
Figura 24. Tempo de equilíbrio para adsorção do vermelho do Congo no monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP.	76
Figura 25. Isotermas de adsorção do CR nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP, MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5.	77
Figura 26. Estrutura molecular da N-nitrosodimetilamina (NDMA).	83
Figura 27. Esquematização do processo de extração DPX em fluxo, empregando sorvente monolítico...	84
Figura 28. Reação de polimerização de TMPTA, MAA e EDMA, iniciada por AIBN, empregando sol. 10 % m/v de PEG 1000 e isopropanol como solventes porogênicos.....	88
Figura 29. Estrutura polimerizada do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).....	89
Figura 30. Espectro de absorção no infravermelho dos monolitos de (A) poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) e (B) poli(TMPTA-co-EDMA).	90
Figura 31. Micrografia SEM representativa dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) com ampliação de 10 kx. Em destaque no canto superior direito: a mesma micrografia ampliada 20 kx.	91
Figura 32. (A) Cromatogramas da solução padrão de NDMA , na concentração de 50 ng mL ⁻¹ , no modo TIC e no SIM, monitorando as m/z 74, 43 e 42 e (B) espectro de massas obtido para o pico do NDMA, registrado em 4,62 min.	92
Figura 33. Porcentagem de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo, empregando o sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente e diferentes eluentes. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; volume de solvente 500 µL.	93
Figura 34. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função dos ciclos de aspiração da amostra. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 µL.	94
Figura 35. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do aumento da força iônica da amostra. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 µL.	95
Figura 36. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do número de ciclos de aspiração de eluente. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 µL.	97
Figura 37. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do volume de amostra. Condições de	

extração: um ciclo de amostra; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 μL ; dois ciclos de eluição de acetonitrila.	98
Figura 38. Cromatogramas nos modos TIC e SIM do extrato de uma amostra em branco e de solução de padrão de NDMA.	100
Figura 39. Curvas analíticas obtidas pelos métodos (A) do padrão externo e (B) do padrão interno para soluções de NDMA em acetonitrila.	101
Figura 40. Cromatogramas da solução padrão de NDMA a 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a definição do LoQ do instrumento.	102
Figura 41. Recuperação de NDMA, empregando processo DPX em fluxo (n=3) com sorventes NIP e MIPs na condições otimizadas e validadas.	105
Figura 42. Estruturas químicas dos princípios ativos das formulações farmacêuticas submetidas ao método DPX proposto. (A) Olmesartana e (B) metformina.	110
Figura 43. Cromatogramas dos extratos das soluções farmacêuticas submetidas ao processo de extração DPX com sorvente monolítico MIP. (A) Olmesartana medoxomila 20 mg, (B) cloridrato de metformina 500 mg e (C) cloridrato de metformina 800 mg.	112
Figura 44. Cromatogramas dos extratos das amostras de soluções farmacêuticas fortificadas com 50 ng mL^{-1} de NDMA obtidos no processo DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA). (A) olmesartana medoxomila 20 mg, (B) cloridrato de metformina 500 mg e (C) cloridrato de metformina 850 mg.	114

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Nitrosaminas	19
1.1.1 N-nitrosodimetilamina	22
1.2 Métodos de preparo de amostras	25
1.2.1 Extração em ponteiras descartáveis (DPX)	26
1.2.2 Sorventes monolíticos	31
1.2.3 Impressão molecular em materiais poliméricos	33
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos gerais	40
2.2 Objetivos específicos	40
2.3 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)	40
CAPÍTULO 3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SORVENTE MONOLÍTICO DE POLI(TMPTA-co-EDMA)	41
3.1 Introdução	42
3.2 Metodologia	43
3.2.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)	43
3.2.1.1 Pré-tratamento das ponteiras de micropipeta	43
3.2.1.2 Otimização das condições de preparação dos monolitos	43
3.2.1.3 Impressão molecular nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)	48
3.2.2 Caracterização morfológica e estrutural do sorventes poli(TMPTA-co-EDMA)	49
3.2.2.1 Avaliação da permeabilidade de água pelos monolitos	49
3.2.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier	49
3.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	50
3.2.2.4 Microscopia de força atômica	50
3.2.2.5 Análise da área superficial específica e propriedades porosas dos monolitos	51
3.2.2.6 Avaliação da macroporosidade dos monolitos	51
3.2.2.7 Análise termogravimétrica	52
3.2.2.8 Densidade real dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)	52
3.2.3 Estudo da capacidade adsortiva do sorvente poli(TMPTA-co-EDMA)	52

3.3 Resultados e discussão	54
3.3.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)	54
3.3.1.1 Estudos preliminares para obtenção de estruturas poliméricas monolíticas permeáveis	54
3.3.1.2 Avaliação de solventes porogênicos na formação da estrutura monolítica porosa	59
3.3.2 Caracterização físico-química dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA)	62
3.3.2.1 Avaliação da permeabilidade de líquidos pelos monolitos	63
3.3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta	64
3.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	65
3.3.2.4 Microscopia de força atômica	66
3.3.2.5 Área superficial específica e propriedades de poros	67
3.3.2.6 Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)	69
3.3.2.7 Análise termogravimétrica	70
3.3.2.8 Densidade real	71
3.3.3 Teste de impressão molecular com vermelho do Congo	72
3.3.3.1 Estudo da macroporosidade dos monolitos impressos molecularmente	72
3.3.3.2 Estudo da adsorção de vermelho do Congo no MIP de poli(TMPTA-co-EDMA)	74
3.4 Conclusões parciais	79
 CAPÍTULO 4 FUNCIONALIZAÇÃO DO SORVENTE MONOLÍTICO	 80
 4.1 Introdução	 81
4.2 Metodologia	82
4.2.1 Preparação dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	82
4.2.2 Impressão molecular do NDMA nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	82
4.2.3 Caracterização dos monolitos de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA)	83
4.2.4 Otimização do método DPX com poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) para extração de NDMA de amostras líquidas	83
4.2.5 Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	85
4.2.6 Validação do método DPX com monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente com NDMA	85
4.2.6.1 Seletividade	85
4.2.6.2 Faixa de trabalho e linearidade	86
4.2.6.3 Limite de quantificação instrumental (LoQ _{INST})	86
4.2.6.4 Exatidão e Precisão	86
4.2.7 Fator de impressão molecular do NDMA	87
4.3 Resultados e discussão	88
4.3.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	88
4.3.2 Caracterização dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	89

4.3.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	89
4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	90
4.3.3 Definição do método de análise por CG-MS	91
4.3.4 Otimização do método de extração DPX em fluxo de NDMA de amostras líquidas	92
4.3.4.1 Tipo de eluente	93
4.3.4.2 Ciclos de aspiração da amostra	94
4.3.4.3 Uso de aditivo na amostra líquida	95
4.3.4.4 Ciclos de aspiração do eluente	96
4.3.4.5 Volume de amostra	97
4.3.5 Validação do método DPX-GC-MS para determinação de NDMA	99
4.3.5.1 Seletividade	100
4.3.5.2 Faixa de trabalho e linearidade	100
4.3.5.3 Limite de quantificação	102
4.3.5.4 Exatidão e precisão	103
4.3.6 Avaliação do fator de impressão da NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)	104
4.4 Conclusões parciais	107

CAPÍTULO 5 APLICAÇÃO DO SORVENTE MONOLÍTICO MIP DE POLI(TMPTA-CO-EDMA-CO-MAA) NA EXTRAÇÃO DE NDMA DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

5.1 Introdução	109
5.2 Metodologia	110
5.2.1 Processamento dos medicamentos	110
5.2.2 Extração DPX de NDMA de formulações farmacêuticas	110
5.3 Resultados e discussão	112

CONCLUSÕES GERAIS

REFERÊNCIAS

CAPÍTULO 1**INTRODUÇÃO**

1.1 Nitrosaminas

As N-nitrosaminas são compostos N-nitrosos conhecidas por serem carcinogênicas e por serem encontradas em vários produtos, como alimentos, bebidas, medicamentos, amostras biológicas e outros, esses compostos têm um grupo nitroso ligado a um grupo amino (SGROI *et al.*, 2018). Podem surgir como impurezas nos produtos devido à alterações químicas durante a fabricação ou armazenamento de fármacos, ou podem ser estimuladas a surgirem como em estudos de degradação forçada (PARR, JOSEPH, 2019, GOLOB *et al.*, 2023). Estudos de degradação forçada são empregados para avaliar a estabilidade do fármaco, expondo o ingrediente farmacêutico ativo (API, *active pharmaceutical ingredient*) e o produto acabado (formulação farmacêutica) à condições de estresse, como luz, temperatura, umidade, hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação (ANDREWS, SHEN, 2013).

Em 2018, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) identificou a presença de N-nitrosodimetilamina (NDMA), uma impureza do tipo N-nitrosamina em APIs do medicamento valsartana (anti-hipertensivo). Posteriormente, outras N-nitrosaminas foram detectadas em fármacos do grupo das "sartanas", bem como em nizatidina, ranitidina (antiulcerosos) e metformina (antidiabético). Em resposta a essas descobertas, as agências reguladoras estabeleceram prazos para que as indústrias farmacêuticas e fabricantes de APIs analisassem seus produtos e processos de fabricação, avaliando o risco de formação ou contaminação por N-nitrosaminas (ANVISA, 2022).

A pesquisa sobre a química das nitrosaminas remonta ao século passado, sendo impulsionada nas décadas de 1950, que associaram essas substâncias ao desenvolvimento de câncer (LIJINSKY, CONRAD, VAN DE BOGART, 1972). Já no final da década de 1950 e início da década de 1960, dados da Noruega indicavam a presença de nitrosaminas como causa de hepatotoxicidade em animais alimentados com ração tratada com nitrito (ENDER *et al.*, 1964). Na Noruega, entre 1957 e 1962, observou-se que animais alimentados com ração de peixe, contendo altas concentrações de nitrito, desenvolviam desordens hepáticas e câncer. A contaminação da ração com NDMA, formada a partir da nitrosação de aminas na ração foi identificada como a causa principal (ENDER *et al.*, 1964). Ao longo da década de 1960, relatos adicionais sobre a presença e formação de N-nitrosaminas em rações motivaram pesquisadores a investigar esses compostos em diversas matrizes, encontrando-as em cervejas na Alemanha e em alimentos, como produtos cárneos curados (LI, ARNOLD, HOZALSKI, 2024).

Lijinsky *et al.* (1972) observaram a possível formação de NDMA *in vivo* pela ingestão de alimentos ricos em nitrito, junto com insumos farmacêuticos ativos contendo aminas terciárias

(LIJINSKY, CONRAD, VAN DE BOGART, 1972). Em 1981, a presença de NDMA e NDEA (N-nitrosodietilamina) foi detectada em formulações de medicamentos contendo aminofenazona, oxitetraciclina e dissulfiram. O NDMA foi detectado em concentrações que variaram de 1 a 900 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em medicamentos à base de aminofenazona, enquanto medicamentos contendo dissulfiram apresentaram teores de NDEA em concentrações na faixa de 94 a 980 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CASTEGNARO, PIGNATELLI, WALKER, 1981).

Outros componentes presentes na formulação de medicamentos também podem ser responsáveis pela geração de N-nitrosaminas. Em 1987, Dawson e Lawrence relataram a contaminação de medicamentos vendidos no Canadá por N-nitrosaminas. Dos 34 medicamentos analisados, 21 estavam contaminados com NDMA e NDEA em concentrações de até 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Em muitos casos, os APIs dos medicamentos não continham em suas estruturas os precursores que justificassem a presença das N-nitrosaminas identificadas. Segundo os autores, é provável que as N-nitrosaminas tenham sido formadas a partir dos excipientes e também possam ter sido transportadas pela água e/ou solventes utilizados no processo de fabricação. Os medicamentos analisados incluíam os APIs amitriptilina, cloranfenicol, clorpromazina, dimenidrinato, eritromicina, imipramina, promazina, propoxifeno, trimipramina e tetraciclina (DAWSON, LAWRENCE, 1987).

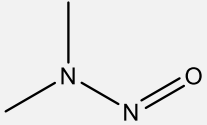
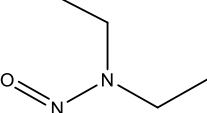
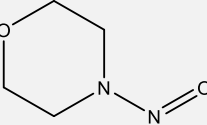
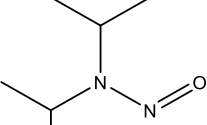
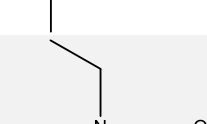
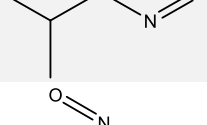
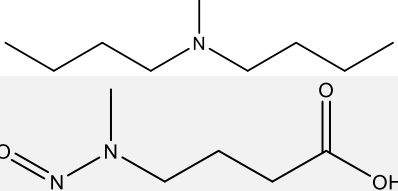
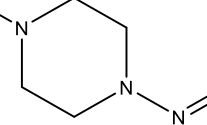
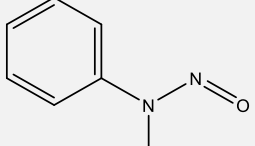
Em 1994, Atawodi e Spiegelhalder constataram que preparações medicinais contendo plantas tropicais nigerianas continham níveis variados de amins primárias e secundárias, além de nitratos e nitritos em menor concentração (ATAWODI, 2003). Diante dessa descoberta e considerando que o amplo uso de preparações de plantas medicinais para fins terapêuticos e profiláticos poderia expor a população a compostos N-nitrosos formados endogenamente, os mesmos autores investigaram a possível formação de N-nitrosaminas voláteis ao expor as preparações medicinais a uma solução que simulava as condições gástricas (ATAWODI *et al.*, 1995).

A possível contaminação de medicamentos por N-nitrosaminas tornou-se uma preocupação de saúde pública recentemente quando a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) foi informada de que algumas empresas detectaram NDMA em seu API valsartana. Essa notificação resultou no recolhimento desse medicamento nos países membros da União Europeia. Posteriormente, estudos confirmaram que a presença de N-nitrosaminas não estava restrita aos medicamentos contendo o API valsartana, sendo identificadas também em outros APIs da classe das "sartanas", como losartana e ibersartana (WU, ESERIAN, LOMBARDO, 2022)

Após esses incidentes, níveis preocupantes de N-nitrosaminas foram detectados em medicamentos contendo APIs tanto da classe das "sartanas" quanto de outras classes, levando ao

recolhimento de centenas de lotes de medicamentos em todo o mundo. Dentre as N-nitrosaminas identificadas, destacam-se a NDMA, NDEA, N-nitrosodiisopropilamina (DIPNA), etilisopropil-nitrosamina (EIPNA), ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico (NMBA), N-nitroso-N'-metilpiperazina (MNP) e metilfenilnitrosamina (NMPA). As estruturas químicas das principais N-nitrosaminas e algumas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas das principais N-nitrosaminas encontradas em medicamentos.

<i>Nitrosaminas (Abreviação)</i>	<i>CAS Fórmula Molecular Massa molar (g mol⁻¹)</i>	<i>Estrutura química</i>	<i>LogP</i>
N-nitrosodimetilamina (NDMA)	62-75-9 C ₂ H ₆ N ₂ O 74,08		-0,57
N-nitrosodietilamina (NDEA)	55-18-5 C ₄ H ₁₀ N ₂ O 102,14		0,48
N-nitrosomorfolina (NMOR)	59-89-2 C ₄ H ₈ N ₂ O ₂ 116,12		-0,44
N-nitrosodiisopropilamina (DIPNA)	601-77-4 C ₆ H ₁₄ N ₂ O 130,19		1,38
Etilisopropil-nitrosamina (EIPNA)	16339-04-1 C ₅ H ₁₂ N ₂ O 116,16		0,77
N-nitrosodibutilamina (NDBA)	924-16-3 C ₈ H ₁₈ N ₂ O 158,14		2,63
Ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico (NMBA)	61445-55-4 C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ 146,14		-0,4
N-nitroso-N'-metilpiperazina (MNP)	16339-07-4 C ₅ H ₁₁ N ₃ O 129,16		0,2
Metilfenilnitrosamina (NMPA)	614-00-6 C ₇ H ₈ N ₂ O 136,15		1,49 ^a

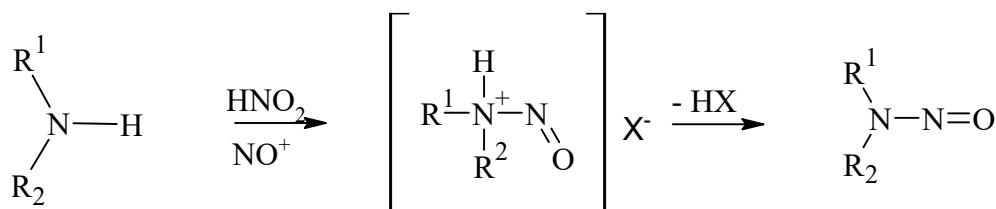
1.1.1 N-nitrosodimetilamina

A N-Nitrosodimetilamina (NDMA) é a mais simples das substâncias pertencente ao grupo das N-nitrosaminas. Essas substâncias têm sido objeto de intensa pesquisa e atenção devido ao seu potencial carcinogênico em seres humanos. A NDMA, em particular, ganhou destaque nos últimos anos devido à sua detecção em medicamentos, levando à preocupações significativas em relação à segurança dos produtos farmacêuticos (SCHMIDTSDORFF *et al.*, 2022).

A NDMA pode se formar em ambientes diversos além dos medicamentos, incluindo processos industriais, produtos alimentícios e até mesmo na água. Sua presença em formulações farmacêuticas tornou-se um ponto crítico devido ao risco potencial à saúde dos consumidores. A compreensão dos mecanismos de formação, as fontes potenciais de contaminação e os impactos na saúde humana são elementos cruciais para abordar os desafios associados à presença da NDMA em produtos farmacêuticos e em diversos contextos ambientais (TUESUWAN; VONGSUTILERS, 2021; AGLIO *et al.*, 2022).

A estrutura geral de uma N-nitrosamina, conforme ilustrada na Figura 1, é caracterizada pela presença de um grupo N-nitroso alifático ligado a uma amina. Essa estrutura inclui uma dupla ligação entre os átomos de nitrogênio, além da ligação de um desses átomos a radicais específicos (representados por R1 e R2), enquanto o outro átomo se conecta a um oxigênio. Portanto, a formação da N-nitrosamina requer a presença de grupos aminas secundárias, terciárias, quaternárias ou outros derivados de aminas (como cianamidas, guanidinas, amidinas, hidroxilaminas, hidrazinas, hidrazonas e hidrazidas) como um dos precursores (TUESUWAN; VONGSUTILERS, 2021; PARR; JOSEPH, 2019).

Figura 1. Reação geral da formação de uma N-nitrosamina.



Fonte: Adaptado de (ANVISA, 2022).

O processo de formação das nitrosaminas ocorre a partir da nitrosação de aminas e agentes nitrosantes, geralmente compostos que contêm grupos NO_x, sob condições específicas de reação. A nitrosação de aminas secundárias, terciárias e compostos de amônio quaternário pelo ácido nitroso (Figura 1) exemplifica o processo geral de formação desses compostos. A estrutura final

da nitrosamina resultante é determinada principalmente pela estrutura da amina que foi submetida ao processo de nitrosação (TUESUWAN; VONGSUTILERS, 2021).

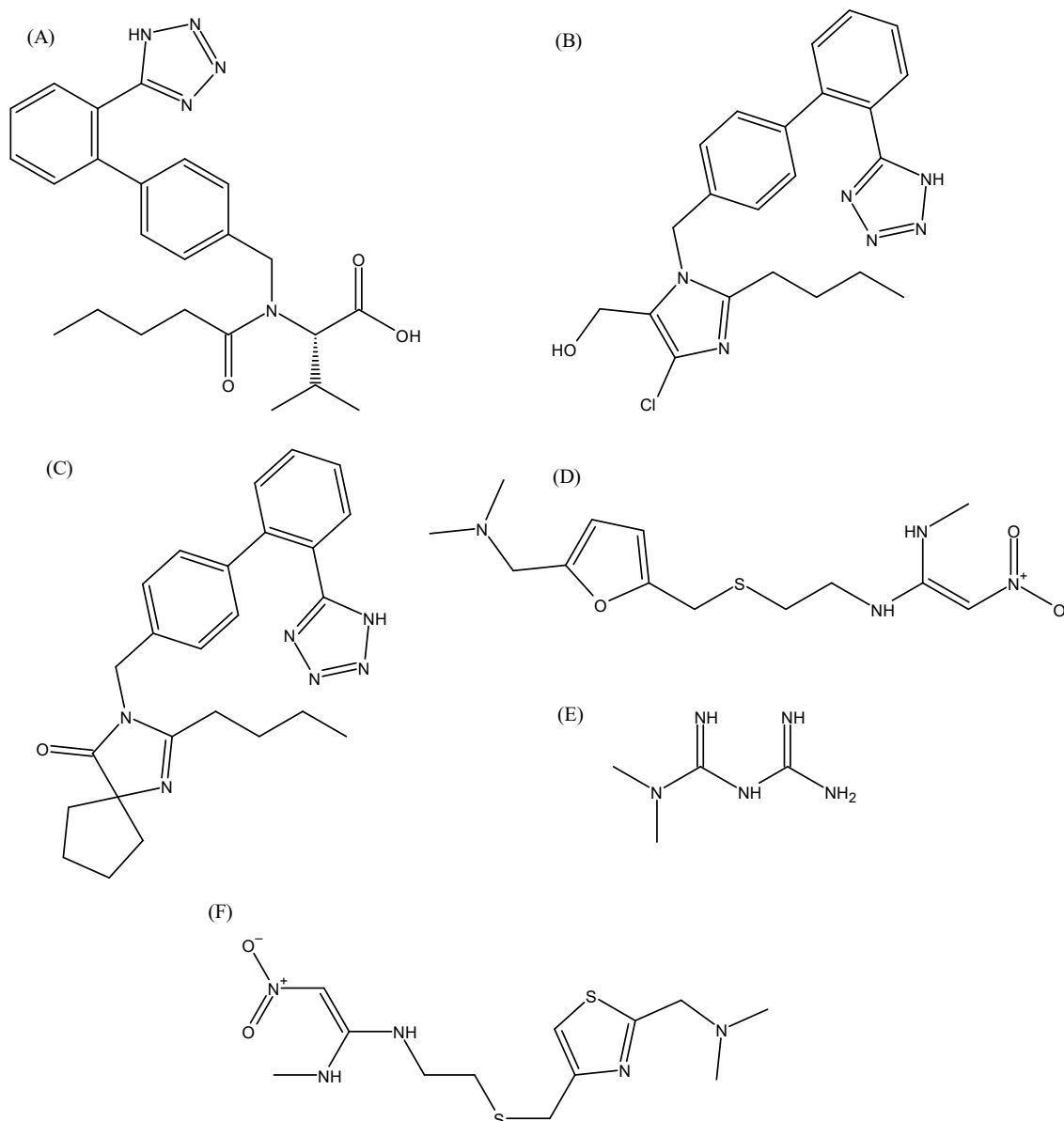
A formação de NDMA a partir de fármacos é um processo que pode ocorrer durante diversas etapas, desde a fabricação até o armazenamento desses medicamentos. NDMA é uma N-nitrosaminac com alto potencial carcinogênico em humanos. A formação desse composto específico a partir de fármacos envolve a interação de precursores, geralmente aminas secundárias ou terciárias presentes nos fármacos, com agentes nitrosantes, frequentemente nitritos ou outros compostos que contêm nitrogênio oxidado (HARMON, 2023; SONG *et al.*, 2023).

De uma forma geral, a formação de NDMA nos medicamentos pode ocorrer por processos distintos:

1. *Presença de precursores*: fármacos contendo aminas secundárias ou terciárias em suas estruturas, as quais podem atuar como precursores para a formação de N-nitrosaminas;
2. *Introdução de agentes nitrosantes*: durante a fabricação, armazenamento ou em condições ambientais específicas, os fármacos podem entrar em contato com agentes nitrosantes, como nitritos provenientes de impurezas, reações químicas ou contaminação ambiental;
3. *Reação de nitrosação*: a reação de nitrosação ocorre quando as aminas secundárias ou terciárias presentes nos fármacos reagem com os agentes nitrosantes, resultando na formação de N-nitrosaminas, incluindo a NDMA. A nitrosação pode ser favorecida em condições como presença de luz, calor, acidez ou outros catalisadores;
4. *Condições propícias para formação*: Fatores como pH, temperatura e presença de outros compostos podem influenciar a taxa e a eficiência da formação de N-nitrosaminas.

A indústria farmacêutica é submetida a regulamentações rigorosas para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos. A detecção de NDMA em fármacos tem levado à recolhimento de produtos e investigações para reduzir os riscos à saúde pública. A identificação de níveis elevados de NDMA em alguns APIs resultou em preocupações significativas em relação à segurança desses medicamentos. Os APIs que demonstraram a formação excessiva de NDMA, ultrapassando as dosagens permitidas, incluem a valsartana, irbesartana, losartana, metformina, ranitidina e nizatidina (PALMA *et al.*, 2023; ALSOLAIS *et al.*, 2023). As estruturas químicas desses APIs estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Estruturas químicas de insumos farmacêuticos ativos em medicamentos que apresentaram NDMA. Valsartana (A), losartana (B), irbesartana (C), ranitidina (D), metformina (E) e nizatidina (F).



Fonte: Adaptado de (AGILO *et al.*, 2022).

Estudos recentes evidenciaram que a presença de NDMA na ranitidina é resultante da degradação intrínseca do API, mesmo na ausência de agentes nitrosantes. Isso ocorre devido à instabilidade inerente do grupamento nitro que pode desencadear a nitrosação. Ao analisar a degradação forçada e a estabilidade acelerada para este fármaco, observa-se que condições como alta umidade relativa, elevada temperatura, presença de luz e oxigênio contribuem para uma degradação acelerada, promovendo a formação de NDMA (TUESUWAN; VONGSUTILERS, 2021; PALMA *et al.*, 2023; HARMON, 2023).

A determinação precisa e contínua da presença de (NDMA) em produtos farmacêuticos é de suma importância devido às implicações críticas para a saúde pública. A NDMA é classificada

como um composto carcinogênico potencial, e sua presença acima dos limites permitidos, 96 ng/dia, representa um sério risco para os pacientes que consomem esses medicamentos. Assim, o monitoramento do teor de NDMA é vital para garantir a conformidade dos produtos farmacêuticos com os padrões regulatórios estabelecidos. A identificação precisa dos APIs propensos à formação de NDMA e as condições que favorecem essa reação são essenciais para aprimorar as práticas de fabricação e armazenamento (GOLOB *et al.*, 2023; KALAUZ *et al.*, 2023). A segurança e eficácia dos tratamentos farmacêuticos dependem da eliminação ou minimização dos riscos associados à presença de NDMA. Portanto, a determinação cuidadosa desse composto contribui diretamente para a proteção da saúde dos consumidores, bem como para a preservação da integridade e confiança na indústria farmacêutica.

Diante disso, torna-se necessária a aplicação de métodos de preparo de amostras confiáveis na extração de NDMA e/ou outras N-nitrosaminas em diversas matrizes, incluindo amostras farmacêuticas, fluidos biológicos como sangue, saliva e urina, entre outros. A escolha cuidadosa de métodos de preparo de amostras desempenha um papel fundamental na obtenção de resultados confiáveis e representativos. Métodos que assegurem a detectabilidade, seletividade e eficiência na extração desses compostos carcinogênicos são cruciais para a precisão das análises. Essa abordagem é essencial não apenas para monitorar a presença de NDMA, mas também para garantir a segurança e qualidade dos produtos farmacêuticos.

1.2 Métodos de preparo de amostras

A análise de contaminantes em diferentes tipos de amostras requer quatro etapas laboratoriais de fundamental importância: coleta da amostra, preparação da amostra, determinação instrumental e avaliação dos resultados (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009). Dentre estas etapas a preparação de amostra é aquela que apresenta o maior tempo gasto, cerca de 60 % do tempo total, e o maior percentual de erro, ~61 % do total de erro em uma análise química, tornando-se, portanto, uma etapa crítica de todo o processo (MAJORS, 2015). Os objetivos de uma preparação de amostras envolvem o isolamento dos analitos da matriz, a eliminação de interferentes naturais e a concentração dos analitos para níveis adequados para a detecção instrumental (NGUYEN *et al.*, 2010; BURATO *et al.*, 2020).

Os métodos de preparação de amostras convencionais são laboriosos, com alto consumo de tempo e de solventes orgânicos tóxicos e caros, que acabam levando à perdas dos analitos e gerando grandes volumes de resíduos tão tóxicos quanto os próprios contaminantes a serem determinados (MAJORS, 2015; BURATO *et al.*, 2020). Dentre os métodos de preparação de

amostras mais empregados na extração de contaminantes de fármacos podem ser citadas a extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) (NEVES *et al.*, 2022; SMIRNOVA; LYSKOVTSOVA; PLETNEV, 2021), extração em fase sólida (SPE, *solid-phase extraction*) (HU *et al.*, 2021; KARRAT; AMINE, 2021), microextração em fase sólida (SPME, *solid-phase microextraction*) (FENG *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2021), extração sortiva em barra magnética (SBSE, *stir bar sorptive extraction*) (HASHEMI; KAYKHAI, 2021; CUI *et al.*, 2021), entre outras.

A extração líquido-líquido também conhecida por extração com solventes foi o principal método de preparação de amostras visando a extração de contaminantes orgânicos por praticamente um século. Apesar de alta eficiência na extração de analitos, uma série de dificuldades como necessidade de uma etapa de limpeza, formação de emulsão, dificuldade de concentração de analitos em níveis traço e alto consumo de solventes orgânicos e tóxicos, levaram a busca por métodos mais completos de preparação de amostras (KANNOUMA *et al.*, 2022).

A técnica de extração SPE é usualmente empregada para pré-concentração do analito de interesse e consiste em extrair os analitos presentes em uma matriz líquida por meio de um cartucho contendo um sorvente sólido particulado e, posteriormente, um solvente orgânico é utilizado para eluir os analitos retidos no sorvente (RAFIQUE *et al.*, 2018). Comparado à LLE, a SPE possui algumas vantagens como menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsão, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito e volumes reduzidos de resíduos. Apesar de todas as vantagens, a SPE apresenta algumas desvantagens relacionadas ao tempo de extração, disponibilidade de material a ser utilizado como sorvente, alto custo dos cartuchos e dos dispositivos multivias para extrações simultâneas (manifolds) (JARDIM; 2010).

A busca por novos métodos de preparo de amostra que sejam rápidos, limpos e simples tem sido uma tarefa árdua para muitos pesquisadores da área. Uma técnica que vem se destacando nesta busca é a extração em ponteiros descartáveis de micropipeta (DPX, *disposable pipette extraction*).

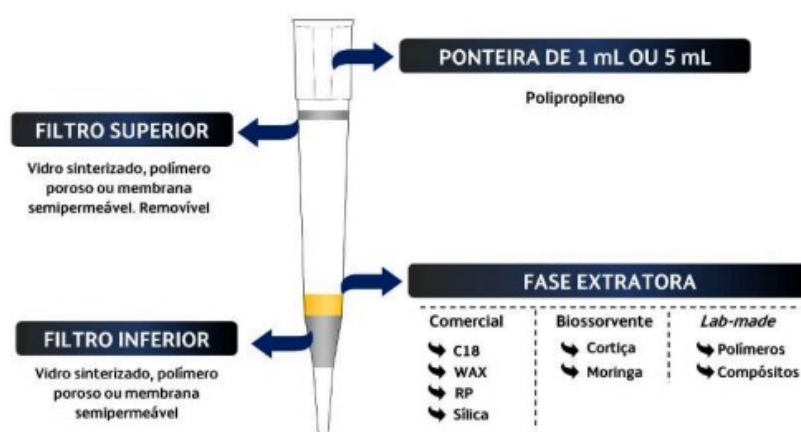
1.2.1 Extração em ponteiros descartáveis (DPX)

A ponteira utilizada na DPX é originária de uma patente desenvolvida em 2003 por William Brewer da Universidade da Carolina do Sul nos Estados Unidos da América (BREWER, 2003). A DPX é uma variante miniaturizada da técnica SPE, permitindo rápida extração em soluções aquosas, porém empregando uma ponteira descartável ao invés de cartuchos de extração. Outro

aspecto da DPX que pode ser comparada a técnica SPE é a diminuição da massa do material sorvente fazendo com que haja uma diminuição no volume de solvente utilizado na etapa de eluição, além de favorecer o processo de sorção e dessorção do analito, resultando em uma diminuição do tempo para o preparo de amostra dentro de um procedimento analítico (GUAN *et al.*, 2010, SILVA *et al.*, 2022; PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2023).

A DPX trata-se de um método único, na qual o sorvente está contido livremente no interior de uma ponteira de polipropileno (Figura 3) e é completamente misturada com a amostra líquida através da aspiração de ar, favorecendo um rápido equilíbrio de sorção do analito (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2021). O sorvente é retido por um filtro inferior e superior. O filtro superior pode ser confeccionado com vidro sinterizado (CARASEK, SCUR, BERNARDI, 2023), polímero poroso (PEREIRA-COELHO *et al.*, 2023), membrana semipermeável (JAKAVULA *et al.*, 2023), metal ou lã de vidro (OLIVEIRA, LANÇAS, 2023). A função primordial do filtro inferior é facilitar a aspiração e liberação de fluidos, como amostras, solventes e ar, sem perda do adsorvente. Já o filtro superior, tem como objetivo principal impedir o vazamento do conteúdo interno e evitar contaminação externa. No âmbito do procedimento DPX, o filtro inferior permite a movimentação fluida de amostras, solventes e ar, enquanto o filtro superior resguarda o conteúdo interno da micropipeta ou do dispositivo utilizado para sucção, assegurando sua integridade (CARASEK, SCUR, BERNARDI, 2023).

Figura 3. Esquema da ponteira DPX comercial.

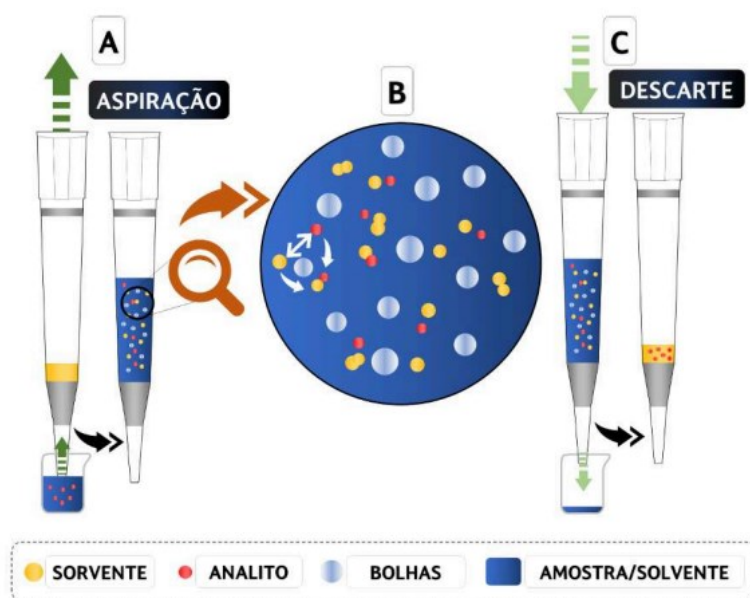


Fonte: Adaptado de (CARASEK *et al.*, 2022).

O princípio de funcionamento do procedimento DPX guarda estreita relação com a SPE, em que a interação/afinidade entre as substâncias a serem analisadas e o sorvente é crucial para a extração. No entanto, a DPX se assemelha à SPE dispersiva, já que a fase de extração está contida livremente na ponta do dispositivo (CARASEK, MORÉS, HUELSMANN, 2022). O

procedimento tem início com a passagem de um solvente ou mistura adequada, ativando a sorvente e preparando os locais de sorção para interagir com diferentes compostos presentes na matriz. Após a expulsão do solvente, a amostra é aspirada para a ponta do DPX, passando pelo filtro inferior junto com o ar, o que provoca uma mistura dinâmica entre a matriz e a fase extratora. A aspiração de ar promove a formação de bolhas no interior (mistura dinâmica), possibilitando uma mistura mais eficaz entre a amostra e o material, dada a grande superfície proporcionada por essas microbolhas. Isso acelera o processo de extração, procedimento esquematizado na Figura 4 (SILVA *et al.*, 2022; CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2021).

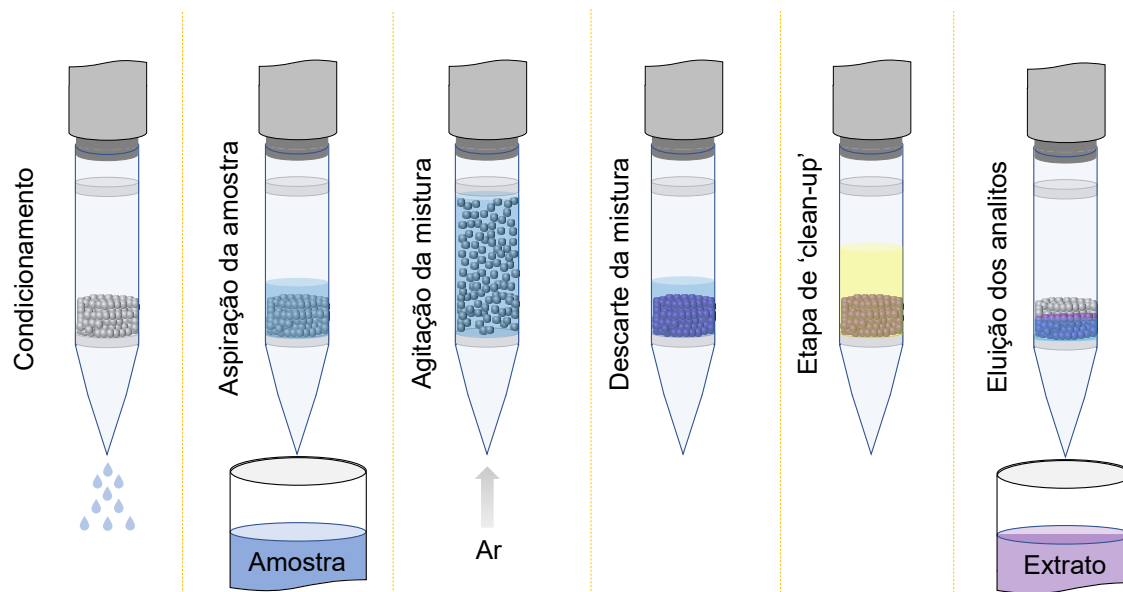
Figura 4. Esquema da mistura dinâmica entre amostra/solvente e sorvente na DPX.



Fonte: Adaptado de (CARASEK *et al.*, 2022).

Após a fase de extração, um solvente diferente do inicial é aplicado para remover possíveis interferentes, sendo a escolha do solvente de limpeza dependente da natureza do analito e da amostra. Finalmente, o solvente extrator é utilizado na etapa de dessorção, seguindo o mesmo procedimento da extração. O extrato final é então coletado em um frasco adequado para injeção no equipamento analítico, e o desempenho completo do DPX é apresentado ao final dessas etapas. O esquema está representado pela Figura 5 (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2021; CARASEK, SCUR, BERNARDI, 2023).

Figura 5. Esquema representativo das etapas de extração de um processo DPX completo.



Fonte: (CASTILHO, 2023)

No procedimento DPX, cada etapa requer otimização para que seja aplicada a um determinado analito em uma determinada amostra, visando alcançar resultados confiáveis, repetitivos e com exatidão (SILVA *et al.*, 2022; CARASEK; SCUR; BERNARDI, 2023).

- *Fase extratora*: a seleção do sorvente é essencial para garantir uma interação eficaz entre os analitos e o adsorvente, maximizando a eficiência de extração;
- *Solvente extrator*: utilizado na etapa de dessorção do analito do adsorvente, influencia diretamente na eficácia da extração do analito;
- *Número de ciclos de extração*: o número adequado de ciclos é fundamental para atingir a eficiência máxima na extração e dessorção dos analitos;
- *Volumes de amostra e de solvente*: As quantidades de amostra e de solvente impactam diretamente a eficiência da extração e o fator de concentração do analito no extrato. A otimização desses volumes é necessária para garantir a máxima recuperação dos analitos;
- *pH da amostra*: pode influenciar a interação entre os analitos e o sorvente caso estes sejam dependentes da condição de acidez do meio. A otimização do pH pode ser essencial para garantir a retenção do analito no sorvente e, consequentemente, eficiência na extração;
- *Efeito de salting-out*: o efeito de força iônica na amostra pode afetar a solubilidade dos analitos e facilitar o processo de retenção destes no sorvente extrator;
- *Tempo de equilíbrio*: o tempo de contato entre o analito e o sorvente influencia a condição de equilíbrio entre esses, sendo um fator crítico na exatidão e na precisão das medidas. A

otimização desse parâmetro visa encontrar o tempo mínimo necessário para que a extração seja repetitiva e eficiente.

Cada um dos parâmetros listados acima desempenha um papel importante na extração DPX de um dado composto de amostras líquidas e sua otimização criteriosa é fundamental para assegurar resultados confiáveis e repetíveis.

Os sorventes disponíveis comercialmente para dispositivos DPX normalmente são aqueles empregados como fases sólidas para SPE (PINTO; QUEIROZ, 2015). O poli(estireno-divinilbenzeno) e o C₁₈ (octadecilsilano) são sorventes que atuam no modo de fase reversa, retendo compostos predominantemente por interações hidrofóbicas de compostos apolares e pouco polares. Sorventes eletricamente carregados a base de resinas orgânicas modificadas com grupos amínicos ou sulfônicos atuam no modo de troca de íons a partir de interações eletrostáticas com analitos eletricamente carregados (SZYNKIEWICZ *et al.*, 2023; SUN *et al.*, 2021). Sorventes à base de sílica nua, alumina ou outros óxidos metálicos atuam na retenção de analitos polares a partir de interações hidrofílicas (PINTO *et al.* 2017; FERNANDES *et al.*, 2018). Uma característica fundamental compartilhada por todos os sorventes disponíveis atualmente para a DPX é a sua apresentação na forma de partículas, essencial para a natureza dispersiva da técnica. A disponibilidade desses sorventes, oriundos de processos cromatográficos e de outros métodos de extração mais consolidados tornam a DPX um método versátil para a extração de diferentes classes de compostos.

No entanto, apesar de toda a versatilidade da DPX em relação à disponibilidade comercial de sorventes, nenhum dos sorventes indicados são seletivos o suficiente para aplicações em que o analito esteja em baixas concentrações em meio a uma matriz complexa, como ocorre com o NDMA em formulações farmacêuticas. Assim, a constante inovação nos materiais adsorventes para a DPX é necessária para ampliar o campo de aplicações analíticas do método. A preparação de novos sorventes para DPX surge como uma necessidade constante, impulsionando a expansão do uso e a exploração da aplicabilidade da DPX. Além disso, os sorventes atualmente disponíveis se encontram na forma de pó finamente dividido, exigindo discos (fritas) para retenção dentro das ponteiras, conforme discutido em estudos anteriores (GUAN; STEWARD, 2014; SHI *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017; MAFRA *et al.*, 2018).

O uso de discos de retenção implica em desafios, pois a passagem de líquido pelo sorvente requer maior pressão positiva, que aumenta proporcionalmente à medida que aumenta a quantidade de sorvente na ponteira ou que diminua o tamanho das partículas do sorvente. Esse cenário pode resultar na rápida perda de precisão e exatidão da micropipeta, comprometendo o volume de amostra e de solvente eluídos pelo processo DPX. Adicionalmente, o uso dos filtros de

retenção pode exigir sistemas pressurizados para a extração dos compostos, acarretando custos adicionais ao processo DPX, bem como comprometer uma eventual portabilidade do método (CHAVES *et al.*, 2015).

Diante dessas considerações, a busca por um método DPX que eliminasse a necessidade de filtros de retenção da fase sólida, porém mantendo o sorvente ‘preso’ dentro da ponteira, proporcionando alta fluidez da amostra e seletividade na retenção de determinado analito, torna-se altamente desejável para uma maior evolução do promissor método de extração, promovendo-o a uma condição de total portabilidade, sem a necessidade de uso de equipamentos ou outros dispositivos elétricos.

Uma alternativa promissora é a preparação de sorventes monolíticos para a extração DPX (LUO *et al.*, 2023). Um sorvente monolítico consiste em um material macroporoso contínuo, assemelhando-se a uma única partícula, frequentemente em formato cilíndrico, com pequenos domínios e canais relativamente grandes (FARIA *et al.*, 2006; NEMA; CHAN; HO, 2014). Esse tipo de sorvente pode ser produzido dentro da ponteira descartável, permanecendo fixo sem a necessidade de filtros de retenção, por aderir às paredes internas da ponteira e apresentar seletividade para certos analitos, conforme os grupos funcionais sejam incorporados no novo sorvente (ZAJICKOVA, 2023).

1.2.2 Sorventes monolíticos

O termo monolito tem origem na palavra grega “monolithos” onde “mono” significa único e “lithos” significa rocha. Para ciências de separação, um monolito é um meio contínuo de separação ou sorção que possui uma estrutura altamente porosa constituída de macroporos (> 50 nm), mesoporos (2 a 50 nm) e microporos (< 2 nm) (FARIA *et al.*, 2006; SVEC, 2010). Os macroporos fornecem a alta permeabilidade à estrutura monolítica, permitindo análises a altas vazões e pressão reduzida (POTTER; HILDER, 2008).

A depender dos precursores de síntese, os monolitos podem ser classificados entre inorgânicos, orgânicos ou híbridos. Os monolitos inorgânicos são preparados a partir de alcóxidos metálicos, podendo ser de zircônia, titânia, porém, o monolito mais utilizado é o de sílica. A preparação do monolito à base sílica consiste em um processo sol-gel, no qual o precursor inorgânico utilizado é o tetrametoxissilano (TMOS) ou o tetraetoxissilano (TEOS) (ZHU; ROW, 2012). Sorventes monolíticos preparados a partir desses precursores apresentam boa estabilidade mecânica, mas apresentam estabilidade química apenas na faixa de pH 2 a 8 (PATEL; GUPTA; UMEKAR, 2022).

O preparo de monolitos poliméricos orgânicos é realizado através de diversos monômeros orgânicos, como os acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, entre outros. Esses materiais apresentam boa estabilidade em uma faixa mais ampla de pH, porém, monolitos de maiores diâmetros podem apresentar efeito de compressão e intumescimento expressivo quando em contato com solventes orgânicos, levando à perda de eficiência na extração. A preparação de monolitos poliméricos orgânicos é relativamente simples, sendo versátil sua funcionalização a partir da derivatização *post-column* para dar a seletividade desejada ao sorvente. Além disso, os monolitos permitem alta permeabilidade de líquidos devido aos longos canais formados por agentes porogênicos de cadeias lineares longas (JANDERA, 2013; TONG *et al.*, 2014; NISCHANG, CAUSON; 2016).

A síntese de monolitos poliméricos normalmente é realizada *in situ* através da polimerização radicalar, foto ou termoativada, em molde preenchido e selado contendo a mistura de monômeros, agentes porogênicos e um iniciador radicalar. A estrutura porosa é controlada pelo tempo e temperatura da reação de polimerização, pela seleção do solvente porogênico e pela razão monômero:solvente porogênico na mistura reacional (GAMA; ROCHA; BOTTOLI, 2019; SVEC, 2010; NISCHANG, CAUSON; 2016). A variação na composição dos monômeros altera a superfície do monolito, além de induzir a formação de diferentes estruturas porosas. A proporção monômero:agente porogênico e monômero:agente de entrecruzamento afeta as propriedades porosas e consequentemente as propriedades morfológicas do monolito. A polaridade dos monômeros é um dos fatores chaves que regem a separação de fase e a formação dos poros (SVEC, 2010, CURRIVAN; JANDERA, 2014).

No início da polimerização, a etapa de separação de fase é dependente da capacidade do solvente porogênico solubilizar os monômeros o que influencia diretamente as características estruturais do monolito formado, que por sua vez tem efeito no desempenho do sorvente monolítico. Se a solubilidade dos monômeros no solvente porogênico for alta, o polímero formado começa a precipitar em estágios posteriores à polimerização, em contrapartida, se o solvente for um solvente ruim (baixa solubilidade dos monômeros) a separação de fase ocorre rapidamente, logo após a formação dos primeiros núcleos do polímero (NISCHANG, CAUSON; 2016).

Se a solubilidade dos monômeros for baixa, a separação de fase ocorre numa etapa em que os monômeros ainda não reagiram, e esses têm mobilidade para coalescer com os núcleos de polimerização. Os primeiros núcleos altamente intercruzados se tornam melhores solventes para o monômero do que o solvente porogênico. Com isso os núcleos aumentam de tamanho dando origem a glóbulos maiores, consequentemente monolitos com macroporos de maiores tamanho e com menor área superficial são formados. Já quando a solubilidade é alta a separação de fase ocorre tardiamente com cinética adequada para os monômeros serem atacados por um número

maior de núcleos de polimerização e, como o número de núcleos é maior, os seus tamanhos são reduzidos, levando a glóbulos menores de maior área superficial (SVEC, 2010; FRECHET, 1995).

A temperatura de polimerização exerce influência na cinética de polimerização e o controle dela é um meio de obter um monólito com diferentes propriedades porosas a partir da mesma composição da mistura reacional. O efeito da temperatura está relacionado a taxa de nucleação, resultando em uma diferença do número de núcleos formados e os seus tamanhos, por consequência, ao se variar a temperatura. Quando a temperatura é baixa a reação de polimerização é lenta e pode ocorrer uma transferência significativa de monômeros da solução para o núcleo. Quando a temperatura é alta aumenta a quantidade de polímeros formados em solução após a etapa inicial de nucleação, que são então capturados por núcleos em crescimento e resultam na formação de glóbulos maiores e uma menor área superficial específica (SVEC, 2010).

O tempo de polimerização também é de extrema importância, pois determina diretamente a taxa de conversão dos monômeros. Quanto maior o tempo de polimerização, maior tendem a ser os tamanhos dos glóbulos poliméricos e menor a área superficial. Se o tempo for curto o grau de polimerização tende a ser baixo e os poros serão menores, resultando em materiais com maior área superficial (SVEC, 2010; FRECHET, 1995).

Para a maioria das aplicações, as estruturas monolíticas formadas não possuem seletividade adequada e se faz necessária uma modificação química. Derivatizações *post-column* podem ser realizadas através da inserção de grupos funcionais na superfície da estrutura monolítica. Neste caso, é comum empregar monômeros funcionais contendo um grupo reativo em sua estrutura que ficará disponível na superfície da estrutura monolítica após a polimerização, tornando-o susceptível à modificação posterior (NASCIMENTO, MASINI, 2024). Adicionalmente, a seletividade do monólito pode ser obtida a partir da impressão molecular de uma substância molde na estrutura monolítica. Essa substância é adicionada à mistura monomérica e submetida à polimerização *in situ*, sendo removida após a obtenção do monólito, porém deixando uma cavidade com forma, tamanho e grupos funcionais de alto reconhecimento molecular (JANDERA, 2014; BATISTA; SILVA; MIZAIKOFF, 2021).

1.2.3 Impressão molecular em materiais poliméricos

Os polímeros impressos molecularmente (MIP, *molecularly imprinted polymers*) representam um desenvolvimento de materiais com alta seletividade para a interação com moléculas específicas. Inspirada por mecanismos biológicos de reconhecimento molecular, essa estratégia visa criar estruturas poliméricas com sítios de ligação personalizados, proporcionando

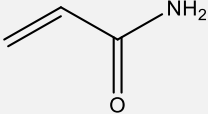
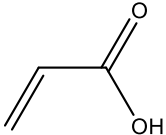
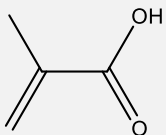
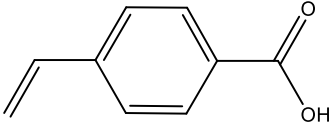
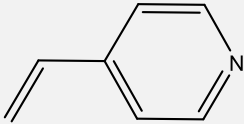
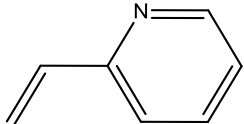
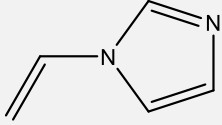
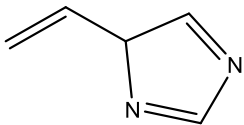
uma imitação precisa da interação chave-fechadura (VILLA *et al.*, 2021). Os MIPs representam uma classe de materiais porosos funcionais que possuem locais de ligação de alta afinidade, meticulosamente projetados para serem complementares em tamanho, dimensão e funcionalidade ao analito de interesse (KAYA; CETINKAYA; OZKAN, 2023; AZIZI; BOTTARO, 2020).

O processo se baseia na produção de polímeros ou resinas com cavidades tridimensionais que se ajustam de maneira exata à forma e às propriedades químicas da molécula-alvo (*template*). Esse *template* é gerado por meio da copolimerização de monômeros funcionalizados na presença da molécula alvo ou pela utilização de uma molécula modelo durante a polimerização (LIU *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2021).

A remoção da molécula-modelo resulta em um polímero com sítios de ligação altamente específicos complementares aos da molécula desejada. Essa abordagem oferece uma elevada seletividade e afinidade pelo analito em uma análise química, tornando-a particularmente interessante em diversas aplicações, tais como sensores eletroquímicos (AHMAD *et al.*, 2019; GUI *et al.*, 2018; REBELO *et al.*, 2018) e sorventes extratores (FERREIRA *et al.*, 2021; ALIPOUR *et al.*, 2021; RAHIMI *et al.*, 2022).

Na impressão molecular a seleção cuidadosa dos reagentes é uma etapa crítica para o sucesso da preparação do monolito com os sítios ativos específicos, tais como a escolha da molécula-modelo, do monômero, do monômero de entrecruzamento, do iniciador radicalar e do solvente porogênico. A combinação desses compostos desempenha um papel crucial na seletividade do polímero impresso molecularmente. É imperativo observar as interações potenciais entre a molécula-modelo e o monômero, uma vez que essas definem a forma de interação dos sítios impressos com o analito posteriormente. A Tabela 2 abaixo lista os principais monômeros utilizados na síntese de MIPs (VILLA *et al.*, 2021; LUO; WU; HUANG, 2023).

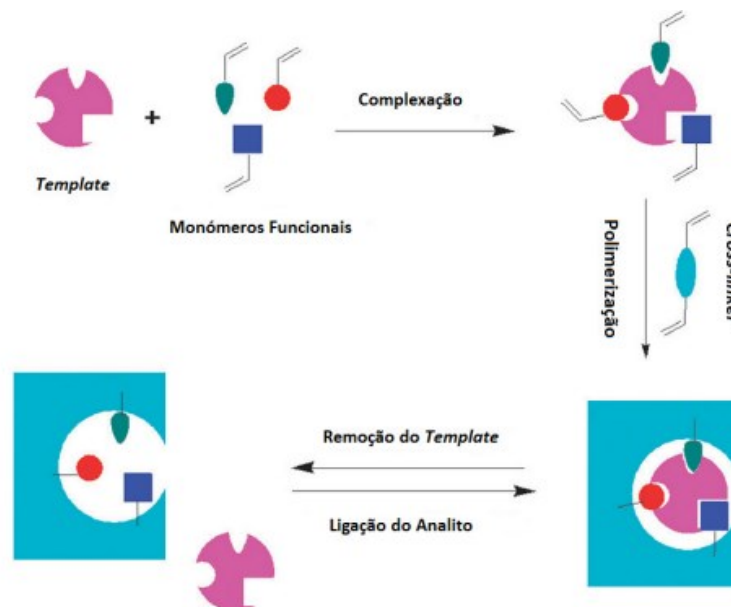
Tabela 2. Principais monômeros utilizados na preparação de polímeros impressos molecularmente.

<i>Estrutura química do monômero</i>	<i>Tipo de monômero</i>	<i>Tipos de interação</i>
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinil benzoico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	4-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	1-vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	4-vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais

Os MIP são preparados convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em “*bulk*”, realizada em um sistema homogêneo. Esta reação é realizada em um compartimento previamente selado contendo os monômeros, a molécula-modelo, solventes porogênicos, monômero de entrecruzamento e o iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio induzida com aquecimento e/ou radiação UV (CHO *et al.*, 2021). O primeiro passo da síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do monômero e da molécula-modelo (*template*). O *template* necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros, a fim de formar uma espécie de complexo estável. A interação *template*-monômero pode se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por

meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica (VELAYATI *et al.*, 2022). A polimerização ocorre em torno do complexo template-monômero, gerando uma cadeia tridimensional. Após a polimerização é realizada a remoção do *template* da estrutura polimérica. As etapas do processo de polimerização com impressão molecular estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Esquema da formação de um MIP.



Fonte: Adaptado de (CHEN *et al.*, 2011).

A seleção dos reagentes é fundamental no processo de impressão molecular. Embora as moléculas *template* geralmente sejam os compostos alvo da análise, nem sempre essa é a escolha mais adequada devido a fatores como o potencial de liberação da molécula da estrutura polimérica. Sem essa liberação a impressão molecular no polímero não ocorrerá, pois os sítios ativos estarão bloqueados com a presença da molécula-modelo fortemente retida. Além disso, a molécula-modelo não deve conter grupos que acelerem ou retardem a polimerização, nem grupos polimerizáveis que a fixem na matriz polimérica (SONG *et al.*, 2022).

No processo de formação do MIP, o monômero funcional tem papel fundamental para o sucesso da impressão molecular, pois ele fornece os grupos funcionais que possibilitam a formação de complexos com a molécula-modelo. A força das ligações entre a molécula-modelo e o monômero funcional afeta a seletividade das cavidades resultantes. O ácido metacrílico (MAA) é frequentemente utilizado como um monômero universal para esta finalidade devido à sua afinidade por ligações de hidrogênio e iônicas (CHEN *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2021). O monômero funcional deve estar em quantidade molar superior à da molécula-modelo na mistura de polimerização,

garantindo a formação do maior número possível de cavidades específicas. Contudo, a relação molar entre esses dois componentes deve ser cuidadosamente estudada, pois quantidades excessivas de monômero podem resultar na formação de cavidades não específicas (HU *et al.*, 2021).

O monômero de entrecruzamento (*crosslinker*) é adicionado à mistura de polimerização para se ligar aos monômeros funcionais formando uma matriz polimérica rígida, estabelecendo ligações cruzadas ao redor da molécula impressa. Essa característica permite que o polímero permaneça intacto após a remoção da molécula template. O tipo e a quantidade de monômero de entrecruzamento devem ser estudados para garantir a rigidez e permeabilidade adequada para o MIP. Assim, é essencial que o monômero de entrecruzamento esteja presente em concentrações superiores às do monômero, garantindo a porosidade do polímero (HU *et al.*, 2021). O dimetacrilato de etilenoglicol (EDMA) destaca-se como um dos monômeros de entrecruzamento mais utilizados devido à sua capacidade de formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis. Sua presença na matriz polimérica contribui para a criação de uma estrutura rígida, assegurando que o MIP mantenha suas propriedades estruturais e de reconhecimento molecular mesmo após a extração da molécula-modelo (SONG *et al.*, 2022).

Os solventes porogênicos também têm sua importância no processo de impressão molecular e deve ser criteriosamente escolhidos e avaliados. O tipo e o volume de solvente porogênico são responsáveis pela solubilização dos monômeros e da molécula-modelo, garantindo a formação do complexo entre estes, que também deve apresentar solubilidade no solvente. Este solvente proporciona um meio para a dissolução dos reagentes e é responsável pela criação dos poros na estrutura polimérica (CHO *et al.*, 2021). Em geral, busca-se um solvente que não interfira na ligação monômero-molécula modelo e que assegure uma morfologia adequada ao polímero.

O iniciador radicalar é o responsável por produzir radicais livres para iniciar e propagar a reação de polimerização. O início da reação geralmente requer energia, que pode ser fornecida por meio de calor (temperatura) ou radiação eletromagnética (radiação ultravioleta – UV, *ultraviolet radiation*) (HU *et al.*, 2021). O uso de radiação UV permite tempos de polimerização significativamente reduzidos, embora seja necessário considerar a fotossensibilidade dos reagentes. Um iniciador comumente empregado é a 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, 2,2'-*azobisisobutyronitrile*). A remoção do oxigênio presente no ambiente de síntese do polímero é necessária uma vez que a presença excessiva de radicais provenientes deste gás no frasco de polimerização pode gerar competição com os monômeros no processo de polimerização. Essa remoção pode ser realizada saturando o meio com gás inerte (nitrogênio, argônio ou hélio) ou por meio de ultrassom (LUO; WU; HUANG, 2023).

A literatura já documentou a utilização de sorventes monolíticos impressos molecularmente, empregando ácido metacrílico (MAA) como monômero, etilenoglicol dimetacrilato (EDMA) como agente de ligação cruzada, e dodecanol ou misturas de solventes como agentes porogênicos (MASINI; NASCIMENTO; VITEK, 2021). Esses sorventes monolíticos foram aplicados com sucesso na extração de agrotóxicos em amostras alimentícias, na extração de antidepressivos em amostras de urina, bem como na extração de drogas de abuso em amostras biológicas (DU *et al.*, 2014; FRESCO-CALA *et al.*, 2018; SORRIBES-SORIANO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020). Essa abordagem demonstra a versatilidade e eficácia dos sorventes monolíticos impressos molecularmente em diversas aplicações analíticas, proporcionando seletividade e eficiência na extração de diferentes classes de compostos em amostras complexas.

Desta forma, buscou-se neste trabalho a preparação de sorventes monolíticos a base de metacrilatos, poli(TMPTA-*co*-EDMA-*co*-MAA) impressos molecularmente com NDMA dentro de ponteiros descartáveis para aplicação no processo DPX de NDMA de amostras de formulações farmacêuticas. A DPX com monolito impresso molecularmente é uma estratégia para obtenção de um método miniaturizado portátil, de alta seletividade e de simples execução, se tornando uma alternativa econômica e analiticamente viável na determinação de contaminação de amostras farmacêuticas por nitrosaminas. A preparação de monolitos poliméricos orgânicos, sintetizados em fase homogênea (*bulk*), foi a abordagem escolhida para este trabalho por possibilitar a impressão molecular simultânea à sua preparação, além de apresentar bom controle sobre o esqueleto polimérico poroso em termos de rigidez e permeabilidade.

CAPÍTULO 2**OBJETIVOS**

2.1 Objetivos gerais

Preparar, caracterizar e aplicar um sorvente monolítico a base de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente com N-nitrosodimetilamina na ponteira descartável de micropipeta (DPX) para extração de NDMA de formulações farmacêuticas. O estudo estará fundamentado no desenvolvimento de um método de preparação de amostra miniaturizado, mais simples, portátil, econômico e ambientalmente viável.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos gerais deste trabalho, buscar-se-á:

- i. Otimizar a preparação de sorventes monolíticos poliméricos orgânicos a partir da polimerização *in bulk* dos monômeros TMPTA, EDMA e MAA na ponta de ponteiras descartáveis de micropipeta de 1 mL;
- ii. Caracterizar os sorventes monolíticos produzidos físico-química e morfologicamente;
- iii. Realizar a impressão molecular da molécula de NDMA nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) a fim de dar seletividade ao sorvente monolítico para a nitrosamina;
- iv. Otimizar e validar um método de extração baseado no processo DPX não-dispersivo;
- v. Aplicar as ponteiras com o sorvente monolítico impresso molecularmente na extração de NDMA em formulação farmacêuticas.

2.3 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Este trabalho está alinhado com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) proposto pela Organização das Nações Unidas nos seguintes temas:

ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

Buscou-se o desenvolvimento de um método para monitoramento de nitrosaminas em formulações farmacêuticas, evitando a comercialização de medicamentos contaminados para a população.

ODS 13 - Ação contra a mudança global do clima: tomar medidas urgentes para combater a mudança climática e seus impactos.

O método proposto é miniaturizado, consumindo menor volume de solventes orgânicos e, portanto, gerando menor volume de resíduos e, conseqüentemente, menor emissão de CO₂.

CAPÍTULO 3

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

DO SORVENTE MONOLÍTICO DE

POLI(TMPTA-co-EDMA)

3.1 Introdução

A preparação de sorventes monolíticos poliméricos envolve a síntese de estruturas sólidas contínuas e porosas, resultantes da polimerização de um monômero funcional e um agente de entrecruzamento na presença de agentes porogênicos e iniciada por um reagente capaz de produzir espécies radicais. As escolhas dos reagentes definem as propriedades físico-químicas e morfológicas do sorvente monolítico polimérico produzido.

O processo tem início com a seleção do monômero, que fornecerá a polaridade da estrutura, sendo que diferentes monômeros conferem propriedades únicas ao polímero final, tais como interação com determinados tipos de moléculas, estabilidade química e resistência mecânica. Entre os monômeros mais empregados em processos de polimerização, destacam-se os metacrilatos, acrilatos, acrilamidas, metacrilamidas e estirenos. Para garantir rigidez e porosidade à estrutura, um monômero de entrecruzamento é adicionado à mistura de polimerização. Este monômero participa do processo de polimerização radicalar, entrecruzando as cadeias dos monômeros funcionais. A formação de poros também é garantida pelo uso de solventes, pois devem solubilizar os monômeros antes da polimerização e não solubilizar o polímero formado, deixando cavidades na estrutura polimerizada por não se polimerizar com os monômeros. Quanto maior a molécula do solvente maior o tamanho dos poros deixados na estrutura polimérica. A polimerização pode ser termo ou foto ativada, cada uma apresenta suas vantagens e, neste trabalho, foi estudada a termopolimerização por se tratar de um processo mais acessível. A polimerização pode ser realizada dentro de moldes específicos, definindo o formato do sorvente produzido.

Neste trabalho, foram empregadas monômeros de acrilatos (TMPTA) e metacrilatos (EDMA) para produção do sorvente monolítico, avaliando diferentes proporções e diferentes solventes porogênicos para produção de uma estrutura sólida rígida, altamente porosa para alta permeabilidade de líquidos. O iniciador radicalar AIBN foi utilizado para iniciar o processo de polimerização, realizada in bulk dentro de ponteiras de 1000 μL de micropipetas, que foram empregadas como molde para a preparação do sorvente monolítico para o processo DPX.

Este capítulo apresenta o estudo de otimização do preparo do sorvente monolítico e a sua caracterização estrutural e morfológica com objetivo de aplicá-lo no processo DPX não dispersivo para extração em fluxo de NDMA de formulações farmacêuticas.

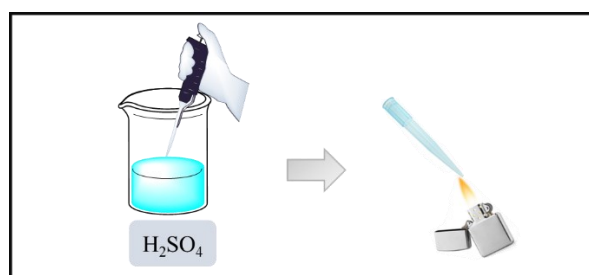
3.2 Metodologia

3.2.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)

3.2.1.1 Pré-tratamento das ponteiros de micropipeta

Inicialmente, ponteiros descartáveis de micropipeta de 1000 microlitros foram tratadas a partir da imersão em ácido sulfúrico concentrado para promover um ataque às suas paredes internas, visando a criação de deformidades no interior da ponteira que pudessem facilitar a adesão da estrutura polimérica monolítica. Em seguida, a ponta da ponteira, extremidade inferior, foi aquecida e vedada, para garantir que a solução ficasse confinada no interior da ponteira, moldando a estrutura monolítica a ser formada. O processo esquematizado está representado na Figura 7.

Figura 7. Esquema do pré-tratamento ácido e vedação da extremidade inferior das ponteiros de micropipeta de 1000 μL .

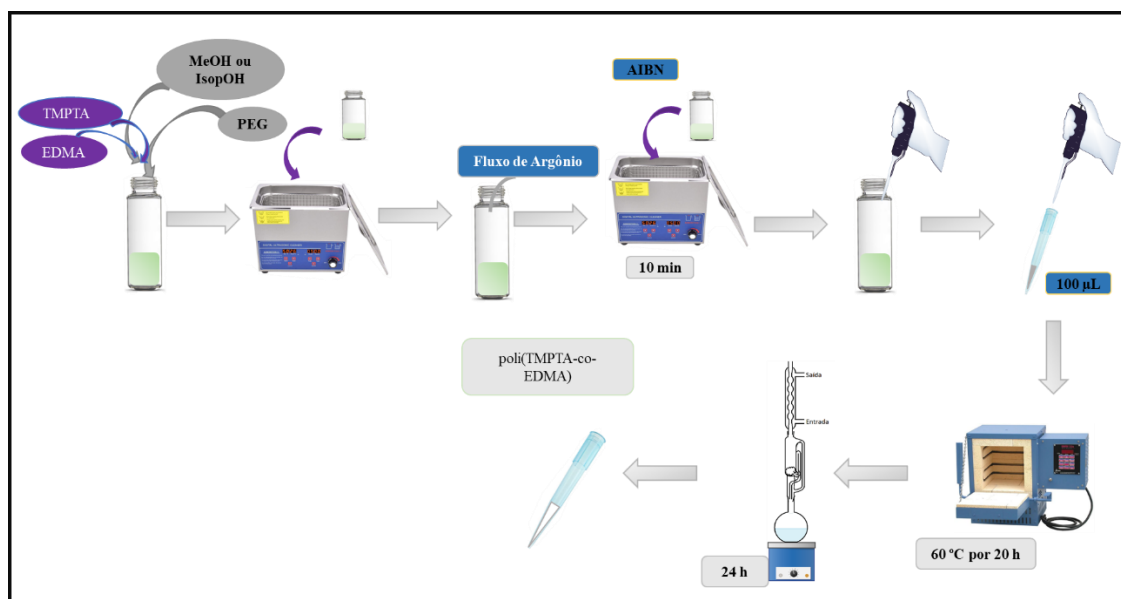


Fonte: Próprio autor.

3.2.1.2 Otimização das condições de preparação dos monolitos

Para a preparação dos monolitos poliméricos, foi utilizado o etilenoglicol dimetacrilato (EDMA) como agente de entrecruzamento, o triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA) como monômero precursor, como solventes porogênicos polietilenoglicol (PEG), metanol (MeOH) e isopropanol (IsopOH) e 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador radicalar. As estruturas químicas de cada um dos reagentes da mistura reacional estão apresentadas na Figura 8.

Figura 9. Fluxograma do processo de preparação do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA).



Fonte: Próprio autor.

As proporções e quantidades de cada um dos reagentes avaliadas na tentativa de obtenção das estruturas monolíticas, utilizando PEG 1000 e MeOH como agentes porogênicos, estão apresentadas na Tabela 3. Como resposta para a obtenção dos sorventes monolíticos desejados, foi avaliada a rigidez da estrutura monolítica e a permeabilidade de líquidos, medindo a vazão de 3,0 mL de água em um sistema manifold a vácuo controlado.

Tabela 3. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando polietilenoglicol 1000 e metanol como agentes porogênicos.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	AIBN	TMPTA	EDMA	PEG	MeOH
#1	1 %	40 % 30,0 %	10,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#2	1 %	40 % 24,0 %	16,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#3	1 %	40 % 20,0 %	20,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#4	1 %	30 % 22,5 %	7,5 %	70 % 28,0 %	42,0 %
#5	1 %	30 % 22,5 %	7,5 %	70 % 42,0 %	28,0 %
#6	1 %	30 % 22,5 %	7,5 %	70 % 56,0 %	14,0 %
#7	1 %	20 % 15,0 %	5,0 %	80 % 16,0 %	64,0 %
#8	1 %	20 % 15,0 %	5,0 %	80 % 32,0 %	48,0 %
#9	1 %	20 % 15,0 %	5,0 %	80 % 48,0 %	32,0 %
#10	1 %	40 % 4,0 %	36,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#11	1 %	40 % 2,0 %	38,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#12	1 %	40 % 8,0 %	32,0 %	60 % 24,0 %	36,0 %
#13	1 %	50 % 5,0 %	45,0 %	50 % 20,0 %	30,0 %
#14	1 %	30 % 3,0 %	27,0 %	70 % 28,0 %	42,0 %
#15	1 %	30 % 18,0 %	12,0 %	70 % 28,0 %	42,0 %
#16	1 %	50 % 30,0 %	20,0 %	50 % 20,0 %	30,0 %
#17	1 %	30 % 9,0 %	21,0 %	70 % 21,0 %	49,0 %

A fim de avaliar o efeito dos agentes porogênicos na porosidade da estrutura monolítica, uma vez que não se produziu monolitos permeáveis nas condições anteriores, o metanol foi substituído pelo isopropanol na mistura de solventes porogênicos. A escolha do isopropanol se deve à estrutura mais volumosa em comparação ao metanol, buscando uma formação de poros maiores na estrutura monolítica. A Tabela 4 apresenta as diferentes proporções estudadas de PEG:isopropanol (experimentos 18, 19 e 20) e de TMPTA:EDMA (experimentos 21, 22 e 23),

mantendo fixa a proporção de monômeros:porogênicos em 30:70, na tentativa de formação da estrutura polimérica rígida e altamente porosa.

Tabela 4. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando polietilenoglicol e isopropanol como agentes porogênicos.

POLI(TMPTA-CO-EDMA)	AIBN	TMPTA	EDMA	PEG	IsopOH
#18	1 %	30 %		70 %	
		9,0 %	21,0 %	21,0 %	49,0 %
#20	1 %	30 %		70 %	
		9,0 %	21,0 %	35,0 %	35,0 %
#21	1 %	30 %		70 %	
		9,0 %	21,0 %	49,0 %	21,0 %
#22	1 %	30 %		70 %	
		15,0 %	15,0 %	21,0 %	49,0 %
#23	1 %	30 %		70 %	
		9,0 %	21,0 %	21,0 %	49,0 %
#24	1 %	30 %		70 %	
		3,0 %	27,0 %	21,0 %	49,0 %

Após avaliar o efeito do isopropanol e de diferentes proporções com o PEG na formação da porosidade da estrutura monolítica, o PEG sólido foi substituído por uma solução de PEG a 10 % (m/v) em metanol, visando diminuir a viscosidade da mistura monomérica e avaliar o efeito na estrutura monolítica. A Tabela 5 apresenta as proporções avaliadas de monômeros:porogênicos, empregando solução metanólica de PEG e isopropanol como solventes porogênicos.

Tabela 5. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando PEG na forma de solução metanólica a 10 % (m/v) e isopropanol como agentes porogênicos.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	AIBN	TMPTA	EDMA	PEG (10 % m/v)	IsopOH
#25	1 %	30 %		70 %	
		9,0 %	21,0 %	21,0 %	49,0 %
#26	1 %	20 %		80 %	
		6,0 %	14,0 %	24,0 %	56,0 %

Após a obtenção do monolito com a estrutura polimérica desejada, foi avaliada a preparação empregando apenas um dos solventes, solução de PEG ou isopropanol, na formação da estrutura porosa monolítica. Para isto, fixou-se as proporções da reação para o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26 e testou-se os solventes porogênicos isoladamente. A Tabela 6

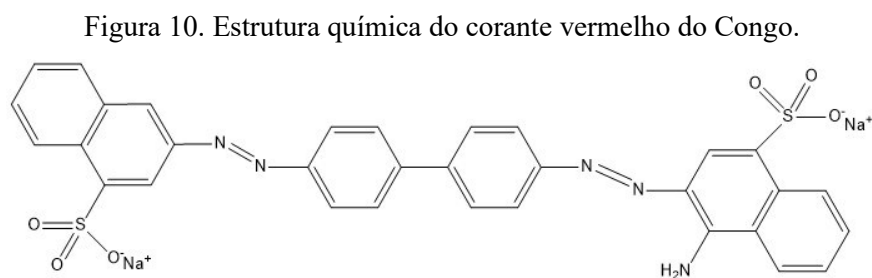
apresenta as condições reacionais, empregando isopropanol (experimento 27) ou uma solução de PEG (10 % m/v) (experimento 28) como agentes porogênicos únicos no processo de polimerização.

Tabela 6. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA), utilizando uma solução 10 % (m/v) de polietilenoglicol ou isopropanol como agente porogênico.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	AIBN	TMPTA	EDMA	PEG (10%)	IsopOH
#27	1 %	20 % 6,0 %	14,0 %	80 % -	80,0 %
#28	1 %	20 % 6,0 %	14,0 %	80,0 %	-

3.2.1.3 Impressão molecular nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)

Para avaliação do potencial da impressão molecular (MIP) na estrutura monolítica foi realizado um teste prévio, antes da impressão com o NDMA, empregando como molécula-modelo o ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico, conhecido popularmente como vermelho do Congo (CR, *Congo red*). O vermelho do Congo é um corante utilizado na indústria têxtil e comumente avaliado por meio de análises bioquímicas e histológicas devido a potencial toxicidade à saúde humana. A estrutura química da molécula do vermelho do Congo está apresentada na Figura 10.



Fonte: próprio autor.

Para avaliar a impressão do vermelho do Congo (CR) no sorvente monolítico foram estudadas três concentrações de CR. Para tal, o CR foi solubilizado em isopropanol, um dos agentes porogênicos na formação da estrutura monolítica, preservando a composição de agentes porogênicos na produção dos sorventes monolíticos definida nas etapas anteriores. As condições estabelecidas para o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26 foram empregadas na avaliação da

impressão molecular do CR, as condições estão apresentadas na Tabela 7. Os monolitos obtidos nesta etapa foram identificados com MIP-CR1, MIP-CR2, MIP-CR5.

Tabela 7. Condições experimentais para impressão molecular de vermelho do Congo no monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	Volume de sol. vermelho do Congo (μL)	Nº de mols de vermelho do Congo (μmol)	Razão molar TMPTA:CR (mol:mmol)
CR1	1425,0	0,68	0,6:1,0
CR2	712,5	0,34	1,2:1,0
CR5	285,0	0,14	3,0:1,0

3.2.2 Caracterização morfológica e estrutural do sorventes poli(TMPTA-co-EDMA)

3.2.2.1 Avaliação da permeabilidade de água pelos monolitos

Um parâmetro importante do sorvente monolítico para aplicação na ponteira descartável de micropipeta é a taxa de fluidez de líquidos através da estrutura porosa, uma vez que nesta proposta a DPX não dispersiva está baseada na extração em fluxo de NDMA. Assim, os monolitos devem apresentar boa permeabilidade de líquidos a baixa pressão para que o processo de extração DPX possa ser realizado manualmente com uso de micropipetas. Neste estudo, as ponteiras contendo os monolitos foram fixadas em um manifold a vácuo de 12 portas, mantendo uma pressão interna em 560 torr ligeiramente inferior à pressão externa. Em cada ponteira foram eluídos 3 mL de água ultrapura, cronometrando o tempo gasto para eluição total. A vazão de água pelos monolitos foi registrada em mL min^{-1} .

3.2.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizados foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) para avaliar os grupos funcionais característicos dos monolitos poliméricos. Cerca de 1 mg do monolito foram prensados no cristal de diamante do espectrofotômetro Agilent Technologies modelo Cary 630 FTIR. As medidas foram realizadas na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e taxa de 128 varreduras min^{-1} . Esta medida foi realizada no Laboratório de Química de Materiais da Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM-Pontal).

3.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscopy*) foi utilizada para a caracterização morfológica dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA). Nesta técnica, os monolitos otimizados foram cortados em pequenos pedaços e os pedaços foram fixados em porta-amstras de aço por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, os pedaços de monolitos foram recobertos com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. Os porta-amstras foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura TESCAN modelo Vega3 (Tóquio, Japão) com microsonda de raios-X. As micrografias dos sorventes monolíticos foram obtidas com diferentes ampliações. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Química de Materiais da Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM).

3.2.2.4 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*) é uma técnica que permite analisar a estrutura de superfícies de materiais com boa resolução e precisão. Os modos de aquisições das imagens ou modos de varredura, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda e a amostra no momento da varredura. As amostras constituídas de pequenos pedaços do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) foram fixadas em um porta amostras de aço inox (aço 430) com o auxílio de uma cera rosa nº 7 a base de parafina. A fim de determinar a rugosidade da superfície das amostras, foram realizadas varreduras (na direção de 0° em relação a X) sobre as amostras utilizando-se o Dynamic Force Mode (SHIMADZU, Chiyoda-ku, Tokyo). Neste modo, as sondas (Tap190Al-G - Budget Sensors) realizaram as varreduras com frequências em torno de 155 KHz. A velocidade de varredura foi configurada para 0.4 Hz, coletando os dados da área de 10×10 micrômetros (resolução de 512×512 pixels) em aproximadamente 22 min, 2,5 segundos por linha. O software utilizado no microscópio SPM9600 durante a aquisição dos dados foi o SPM Manager versão 3.04. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Química de Materiais da Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM).

3.2.2.5 Análise da área superficial específica e propriedades porosas dos monolitos

Os sorventes monolíticos otimizados foram submetidos à determinação da área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poros. Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. A área superficial específica foi determinada pelo método BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) (GREGG; SING, 1982) a pressões relativas (p/p_0) entre 0,05 e 0,30, na qual p e p_0 são, respectivamente, as pressões de equilíbrio e de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de ~0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET (GREGG; SING, 1982), conforme Equação 1.

$$d_p = \frac{4 V_p}{S_{BET}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que d_p : diâmetro médio de poros (nm); V_p : volume de poros ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e S_{BET} : área superficial específica ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$) obtida pelo método BET.

3.2.2.6 Avaliação da macroporosidade dos monolitos

A macroporosidade dos monolitos (ϵ) é definida como o volume dos poros dividido pelo volume total do monolito poroso. Esta medida pode ser obtida de forma gravimétrica a partir da saturação dos materiais porosos em um solvente. Os sorventes monolíticos otimizados foram imersos em butanol por 2 h e, após esse tempo, o excesso de solvente foi removido com um papel absorvente e a massa do monolito foi pesada em intervalos de tempo pré-definidos. A porosidade foi calculada a partir da Equação 2.

$$\epsilon = \left(\frac{(m_{MS} - m_M)/\rho_S}{\left(\frac{(m_{MS} - m_M)}{\rho_S} \right) + \left(\frac{m_M}{\rho_P} \right)} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que: m_{MS} (massa de monolito com solvente), m_M (massa monolito seco), ρ_S (densidade do solvente, butanol $0,808 \text{ g cm}^{-3}$) e ρ_P (densidade do polímero).

A macroporosidade é obtida a partir do método de saturação de fluido, sendo um método barato que independe de requisitos como regularidade, uniformidade de tamanho e forma, da natureza da morfologia e distribuição dos poros no sorvente monolítico.

3.2.2.7 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica dos sorventes monolíticos otimizados foi avaliada por análise termogravimétrica (TG, *thermogravimetric analysis*), na qual um pedaço do monolito previamente cortado de cerca de 5 mg foi colocado na microbalança do analisador térmico e submetidos a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, relacionando a diminuição da massa do sorvente monolítico com o aumento da temperatura. As medidas foram realizadas sob atmosfera de N₂ em um analisador termogravimétrico da TA Instruments modelo TGA-55 (New Castle, DE, EUA), localizado na RELAM-Pontal.

3.2.2.8 Densidade real dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)

A densidade real de um monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado foi determinada utilizando um picnômetro a gás hélio da marca Micromeritics, modelo Accupyc 1331. A sensibilidade de medida do picnômetro a gás utilizado foi de 10⁻⁴ g cm⁻³. Diferentes pedaços dos monolitos foram colocados no equipamento, sendo as medidas realizadas em quintuplicatas e os resultados obtidos apresentam as médias dessas medidas. O picnômetro determina o volume da amostra a partir da mudança de pressão observada no gás hélio que se expande de uma câmara contendo a amostra para a outra sem amostra. Com a massa da amostra já conhecida, determina-se a densidade real. A densidade determinada por picnômetro é a densidade real calculada pela razão entre a massa da amostra e o volume que ela ocupa.

3.2.3 Estudo da capacidade adsortiva do sorvente poli(TMPTA-co-EDMA)

A capacidade de adsorção dos sítios ativos dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizados foi medida a partir de um estudo da adsorção do vermelho do Congo (CR), empregado como soluto teste. A solução de CR apresenta coloração vermelha e que, portanto, pode ser quantificada espectrofotometricamente na região do visível. Para o estudo de adsorção do CR nos monolitos, as soluções foram periodicamente analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 500 nm. Para quantificar o CR foi construída uma curva analítica a partir da medida de absorbância de soluções padrão de CR nas concentrações de 0,10; 0,25; 0,40; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 µg mL⁻¹.

O tempo de equilíbrio entre o adsorvente (monolito) e o adsorbato (CR) foi determinado a partir de uma solução de CR a 0,50 µg mL⁻¹ que foi deixada em contato com o monolito nos

tempos de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 90,0 min. Para cada tempo estudado foi realizada uma leitura espectrofotométrica da solução de CR após o contato com o monolito, para determinar a quantidade não adsorvida do adsorbato no sorvente monolítico.

A capacidade máxima de adsorção do CR nos suportes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) com e sem impressão molecular, foi determinada deixando em contato pelo tempo de equilíbrio estabelecido anteriormente. As concentrações de CR estudadas foram de 0,10; 0,25; 0,40; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada concentração de CR avaliada foi empregado um monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado preparado dentro de um mesmo lote (produzidos simultaneamente com uma mesma solução monomérica). Após o tempo de equilíbrio entre o adsorvente e o adsorbato, cada solução foi medida no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 500 nm.

3.3 Resultados e discussão

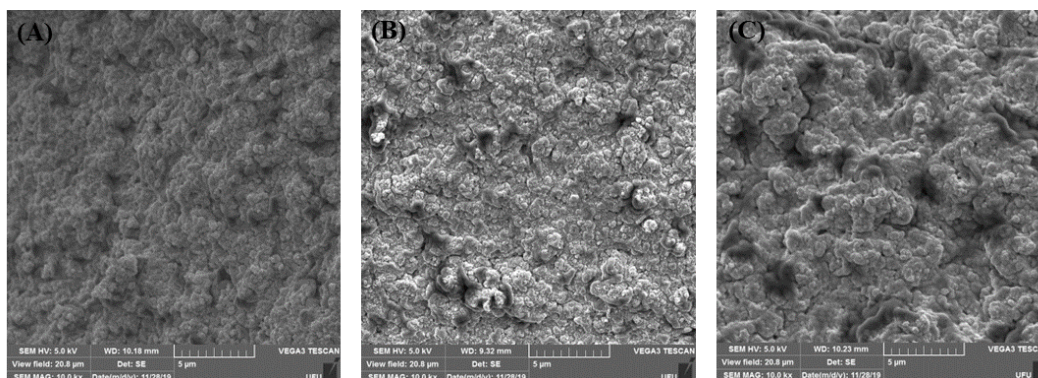
3.3.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)

A fim de preparar um sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA) com formato da ponteira de 1000 μL , com permeabilidade e rigidez adequada. Para a obtenção dos sorventes monolíticos com as características citadas, as condições de preparação foram ajustadas etapa-a-etapa seguindo as quantidades descritas na Tabela 3, por este motivo os sorventes monolíticos foram identificados neste trabalho pela ordem de preparação. Para facilitar a discussão dos resultados obtidos as reações foram separadas em duas partes: (i) as que não formaram o monolito ou formaram fora das características desejadas e (ii) as que resultaram na formação do sorvente monolítico com as características desejadas para a extração na ponteira descartável. Em cada reação eram produzidos pelo menos 10 (dez) monolitos e os resultados discutidos a seguir se referem à média destas preparações monolíticas.

3.3.1.1 Estudos preliminares para obtenção de estruturas poliméricas monolíticas permeáveis

Para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #1 a #3 foi mantida fixa a proporção de 40:60 % (m/m) entre a mistura monomérica e a mistura porogênica. Para essas reações foi variada a quantidade de TMPTA dentro da mistura monomérica de 75, 60 e 50 %, respectivamente. Nestas condições houve a formação dos monolitos, porém não houve eluição de solvente pelo sorvente durante o teste de permeabilidade com água, provavelmente esta condição se deu em função do baixo teor de solvente porogênico, responsável pela formação dos poros, possibilitando a permeabilidade de líquidos. Com intuito de conhecer o material produzido foi realizada micrografias dos monolitos produzidos. As micrografias estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11. Micrografias dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #1 (A), #2 (B) e #3 (C), com ampliação de 10 kx.

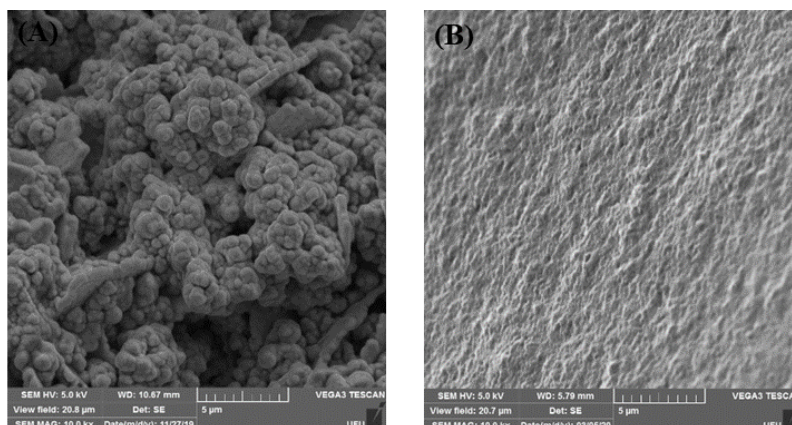


Fonte: próprio autor.

A Figura 11 apresenta imagens do interior da estrutura dos monolitos, obtidos nas reações identificadas como #1, #2 e #3, como uma massa contínua sem cavidades perceptíveis em seu interior, ou seja, sem estrutura de canais. É possível observar que os glóbulos característicos de estruturas poliméricas não foram formados adequadamente (ALHARTHI; EL RASSI, 2020). A ausência de poros na estrutura monolítica visíveis nas micrografias do SEM explica a falta de permeabilidade de solvente pelo material e pode estar associada à quantidade de solvente porogênico na mistura reacional (MANSOUR *et al.*, 2020).

Com base nos resultados obtidos anteriormente foi proposto o preparo dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #4, #5 e #6. Para essas reações foi alterada a proporção entre monômeros:solventes porogênicos de 40:60 para 30:70 % (m/m), aumentando a proporção do agente porogênico de maior massa molecular (PEG 1000), respectivamente, de 40 para 60 e 80 %. Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #4 e #5 resultaram em estrutura monolítica rígida moldada pela ponteira da micropipeta, porém, novamente sem possibilitar a permeabilidade de líquidos. A reação #6 não resultou na formação de uma estrutura monolítica na ponteira. Assim, para avaliar a produção dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #4 e #5 foram obtidas micrografias de SEM que estão apresentadas na Figura 12.

Figura 12. Micrografias dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA)#4 (A) e #5 (B), com ampliação de 10 kx.



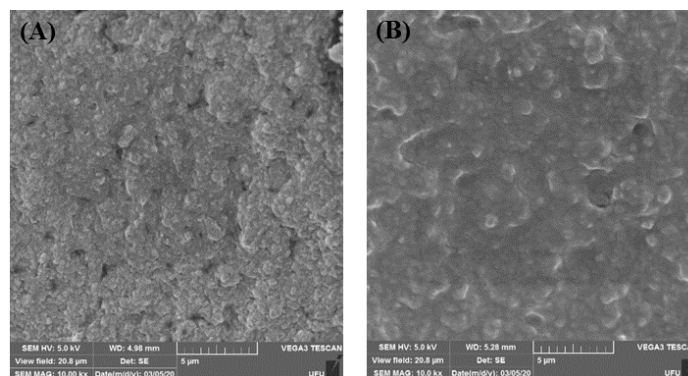
Fonte: Próprio autor.

A micrografia do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #4, Figura 12A, apresenta uma diferença na estrutura quando comparada às dos monolitos da Figura 11, uma vez que é possível observar cavidades em sua estrutura entre domínios globulares que estão melhor definidos. Estas estruturas globulares são próprias de polímeros orgânicos a base de metacrilatos (MAYA; PAULL, 2019). Mesmo com presença destas cavidades entre os glóbulos não foi possível obter a passagem de solvente pelo monolito, possivelmente por não haver interconexão entre as cavidades, ou seja, formação de longos canais que possibilitem a permeação de fluidos. Para o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #5 (Figura 12B) houve a formação de uma estrutura compactada, altamente densa, sem a definição dos aglomerados globulares e sem presença de cavidades visíveis nas micrografias, indicando assim que as condições de obtenção do monolito não foram adequadas para os objetivos delineados para o material.

Apesar de não se obter um resultado satisfatório nestas preparações, houve indícios de uma melhor formação da estrutura monolítica com o aumento da proporção de solventes porogênicos. Assim, a proporção entre a mistura monomérica e mistura porogênica foi alterada de 30:70 para 20:80 % (m/m) na preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #7, #8 e #9, avaliando a influência do PEG na mistura porogênica em 40, 60 e 80 %, respectivamente.

As reações de preparação dos poli(TMPTA-co-EDMA) #7, #8 e #9 resultaram na formação de estruturas monolíticas rígidas, porém novamente sem a permeabilidade de líquidos pelo material. As micrografias dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #8 e #9 estão apresentados na Figura 13, o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) da reação #7 ficou retido na ponteira, não sendo possível a sua remoção.

Figura 13. Micrografias dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA)#8 (A) e #9 (B), com ampliação de 10 kx.



Fonte: Próprio autor.

Através das micrografias apresentadas na Figura 13 é possível observar que para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #8 e #9 formou-se uma estrutura densa sem a presença de poros ou cavidades evidentes que possibilitassem a passagem de solvente pelo monolito. Uma vez que o aumento da proporção dos agentes porogênicos na mistura reacional não resultaram em formação de estrutura porosa adequada para o sorvente monolítico, buscou-se avaliar o efeito da proporção de agente de entrecruzamento (EDMA) na mistura monomérica para a formação dos poros. O agente entrecruzante tem a finalidade de conectar as cadeias poliméricas do monômero funcional de forma a abrir a estrutura polimérica, possibilitando a formação de canais (MAYA; PAULL, 2019).

Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #10, #11 #12 foram preparados utilizando 90, 95 e 80 % de EDMA, respectivamente. Essas quantidades de EDMA foi variada na mistura monomérica, mantendo a proporção de 40:60 % (m/m) entre a mistura monomérica e a mistura porogênica. No entanto, para essas três reações não foi possível formar uma estrutura monolítica sólida, restando solução dentro da ponteira após 20 h de aquecimento a 60 °C. Assim, a quantidade de solvente porogênico foi alterada, testando a proporção de 50:50 e 30:70 % (m/m) mistura monomérica:mistura porogênica, fixando 90 % de EDMA na mistura monomérica, na tentativa de se obter a estrutura monolítica sólida e avaliar a capacidade de formação de poros com alta porcentagem de entrecruzante. As reações foram identificadas como poli(TMPTA-co-EDMA) #13 e #14.

Para essas reações foram obtidas as estruturas monolíticas sólidas dentro das ponteiras sem permeação de líquidos. A área superficial específica e a porosidade dos sorventes obtidos nas reações #14 e #15 foram avaliadas pela medida de adsorção de gás N₂. A Tabela 8 apresenta os dados de área superficial (S_{BET}), volume de poros (V_p) e diâmetro de poros (d_p) dos sorventes monolíticos.

Tabela 8. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) obtidos nas reações #13 e #14.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	$S_{(BET)}$ ($m^2 g^{-1}$)	V_P ($cm^3 g^{-1}$)	D_P (nm)
#13	1,48	0,0069	18,8
#14	0,70	0,0007	4,0

Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #13 e #14 indicaram baixa área superficial específica pelo método BET e um volume de poros consideravelmente pequeno comparado com outros materiais monolíticos relatados na literatura (MASINI; NASCIMENTO; VITEK, 2021), indicando que a estrutura monolítica não é porosa o suficiente para possibilitar a permeabilidade de líquidos por sua estrutura. Portanto, a variação da proporção da mistura monomérica em relação à mistura porogênica, mantendo uma alta porcentagem de EDMA na mistura reacional não é efetiva para obtenção de uma estrutura altamente porosa dos monolitos de poli(PMTPA-co-EDMA) como se esperava. A quantidade de EDMA foi então reduzida novamente para 40 % na mistura monomérica nas reações #15 e #16, mantendo-se as proporções de mistura monomérica e mistura porogênica de 30:70 e 50:50 %, respectivamente. Nestas reações houve a formação dos monolitos sólidos sem permeabilidade de líquidos.

Diante do insucesso com baixo teor < 50 % ou alto teor >90 % de entrecruzante dentro das condições estudadas, mas entendendo que este possui um papel fundamental na abertura da estrutura polimérica, possibilitando a criação de canais internos (MAYA; PAULL, 2019; MANSOUR *et al.*, 2020), uma condição intermediária de EDMA, com 70 % na mistura monomérica foi avaliada, fixando a proporção entre a mistura monomérica:mistura porogênica em 30:70 % (m/m) - reação #17.

Nestas condições, além da formação da estrutura monolítica, pela primeira vez, uma pequena vazão de água foi obtida no teste de permeabilidade do monolito. Cerca de 500 μ L foram eluídos após 10 min de eluição pelo sistema manifold a 560 mmHg. Utilizou-se então acetona para verificar a permeabilidade deste líquido pelo monolito, pois a acetona possui uma viscosidade (0,33 cP) menor que a da água (1,00 cP) a 20 °C. A acetona eluiu mais rapidamente pelo monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #17, indicando a possível formação de poros muito estreitos na estrutura monolítica dentro das condições estudadas.

Levando em consideração as possíveis aplicações dos monolitos enquanto sorventes, se faz necessária a permeabilidade de líquidos com maiores viscosidades que a acetona e, provavelmente, maiores que a da água, uma vez que muitas amostras são constituídas por matrizes aquosas ou apresentam alta viscosidade em virtude da mistura de sais e outras substâncias em sua composição.

Assim, buscou-se avaliar outras condições de preparação dos monolitos a partir da proporção TMPTA:EDMA 30:70 % m/m, a fim de se obter uma estrutura monolítica macroporosa, garantindo uma permeabilidade adequada de fluidos.

3.3.1.2 Avaliação de solventes porogênicos na formação da estrutura monolítica porosa

A partir dos resultados obtidos com a composição da mistura monomérica, foi proposta a mudança de um dos constituintes da mistura porogênica, a substituição do metanol (álcool de cadeia linear curta) pelo isopropanol. O isopropanol (propano-2-ol) é um álcool secundário que possui uma estrutura mais volumosa que o metanol, podendo fornecer uma maior contribuição para a abertura da estrutura sólida levando à formação de poros maiores no sorvente monolítico.

O monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #18 foi preparado seguindo as mesmas condições da reação do poli(TMPTA-co-EDMA) #17 com a substituição do metanol pelo isopropanol. Nesta condição, houve a formação da estrutura monolítica sólida moldada no interior da ponteira descartável. A permeabilidade pelo monolito foi avaliada pela passagem de água e de acetona, obtendo uma boa permeabilidade para acetona, $\sim 1 \text{ mL min}^{-1}$. Em função do resultado promissor, os monolitos obtidos nesta reação foram caracterizados quanto à área superficial específica e porosidade por medidas de adsorção de N_2 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) #18.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	$S_{\text{(BET)}}$ ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_P ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	d_P (nm)
#18	16,45	0,0526	12,8

Com a substituição do metanol pelo isopropanol há um aumento da área superficial específica (S_{BET}) quando comparado com os monolitos preparados com metanol, corroborando com os resultados da permeabilidade de líquidos e equivalente aos materiais poliméricos porosos para finalidade de extração (RIBEIRO; MASINI, 2018). Os resultados da Tabela 9 indicam ainda que o monolito produzido pode ser considerado, de uma forma geral, mesoporoso uma vez que o diâmetro médio de poros está na faixa de 2 a 50 nm. Como o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #18 indicou uma maior passagem de líquidos pela estrutura monolítica, o mesmo foi submetido a uma extração de resíduos de material não polimerizado, via extração Soxhlet por 24 h com 30 mL de água e 30 mL metanol, para remoção de reagentes que não foram polimerizados. A área superficial específica e a porosidade do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #18 após a extração foram medidas por adsorção de N_2 e os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #18 após extração Soxhlet.

POLI(TMPTA-CO-EDMA)	S_(BET) (m² g⁻¹)	V_P (cm³ g⁻¹)	d_P (nm)
#18ex	45,20	0,1662	14,7

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10 é possível observar um aumento da área superficial específica (S_{BET}) e do volume total de poros (V_p), indicando que o processo de extração de reagentes pós-polimerização pode ter removido reagentes residuais do interior dos poros, desobstruindo-os. Isso porque há um aumento significativo do volume total de poros nos monolitos e, por consequência, na área superficial específica, sem aumentar o diâmetro médio dos poros de forma significativa. A partir desta etapa, todos os monolitos produzidos foram submetidos à extração Soxhlet. Após a extração o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #18ex foi submetido a um novo teste de permeabilidade, eluindo a acetona de forma mais rápida, $\sim 5 \text{ mL min}^{-1}$, porém a água de forma mais lenta, $< 0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Para aumentar a vazão de água pelos monolitos, foram mantidas as proporções de 30:70 % (m/m) da mistura monomérica:mistura porogênica, porém foram reduzidas as porcentagens de isopropanol na mistura porogênica para 50 e 30 %, respectivamente, nos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #20 e #21. A estrutura monolítica sólida foi produzida em ambos os monolitos, no entanto, foi possível a permeação apenas de acetona, sem a passagem de água. As medidas de área superficial e porosidade foram realizadas para os monolitos #20 e #21 e a Tabela 11 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 11. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA) #20 e #21.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	S_(BET) (m² g⁻¹)	V_P (cm³ g⁻¹)	d_P (nm)
20	18,20	0,0937	20,6
21	18,50	0,0648	14,0

De acordo com os resultados da Tabela 11 é possível inferir que a área superficial específica e o volume total de poros se mantiveram praticamente constantes com a pequena variação na quantidade de isopropanol. Esse resultado foi um indicativo de que a mudança na proporção dos solventes porogênicos não parece ser suficiente para mudar as características de poros da estrutura monolítica. Apesar do ganho de porosidade frente os monolitos preparados em MeOH, os monolitos ainda não apresentaram a permeabilidade de água desejada para serem utilizados como

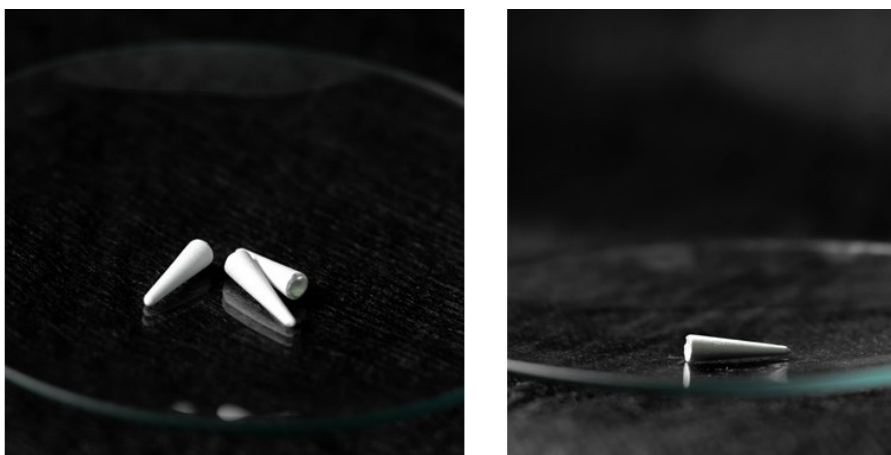
sorventes extratores para processos de extração em fluxo como a DPX proposta neste trabalho. Desta forma, novamente buscou-se avaliar o efeito do entrecruzante EDMA na formação de poros da estrutura monolítica, porém com a nova composição de solventes porogênicos.

Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #22, #23 e #24 foram realizados utilizando 50, 70 e 90 % de EDMA na mistura monomérica, respectivamente. Para os monolitos #22 e #24 não houve permeabilidade de água ou acetona. Já para o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #23, com 70 % de EDMA, houve permeabilidade de acetona e de uma pequena alíquota de água, $< 0,2 \text{ mL min}^{-1}$, ainda insatisfatória para a aplicação desejada.

Das variações realizadas na preparação dos monolitos apenas o monômero estrutural, TMPTA, o agente porogênico PEG e o iniciador radicalar AIBN se mantiveram fixos. Desta forma, optou-se por modificar a forma com que o PEG é adicionado à mistura reacional. O PEG era adicionado na forma de pellets à mistura reacional, tornando a mistura reacional muito viscosa após a dissolução do PEG. Assim, o PEG sólido foi substituído por uma solução metanólica de PEG a 10 % (m/v) para reduzir a viscosidade da mistura reacional e avaliar a influência na formação de poros da estrutura polimérica. A viscosidade do meio reacional pode ser limitante na formação da estrutura monolítica porosa de polímeros orgânicos (MANSOUR *et al.*, 2020).

O monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #25 foi preparado com a solução de PEG, mantidas as demais condições idênticas ao do monolito #24. Nesta condição foi observada uma melhora na permeabilidade da água, obtendo-se uma vazão de $\sim 0,5 \text{ mL min}^{-1}$ pelo monolito de poli(TMPTA-co-EDMA). Optou-se então por alterar a proporção da mistura porogênica em relação à mistura monomérica de 30:70 para 20:80 % (m/m), com intuito de compensar a diminuição de PEG na mistura reacional, e verificar o seu efeito na porosidade dos monolitos, resultando no monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26. Esta condição resultou na passagem de água pelo monolito, indicando uma permeabilidade adequada para a finalidade pretendida para o sorvente monolítico, obtendo-se uma vazão média de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA). A partir desse resultado, as condições da reação para preparação do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26 foram definidas como a condição ótima para a produção dos monolitos porosos. Os monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26 produzidos foram fotografados e as imagens estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Fotografia do monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26.



Fonte: Próprio autor.

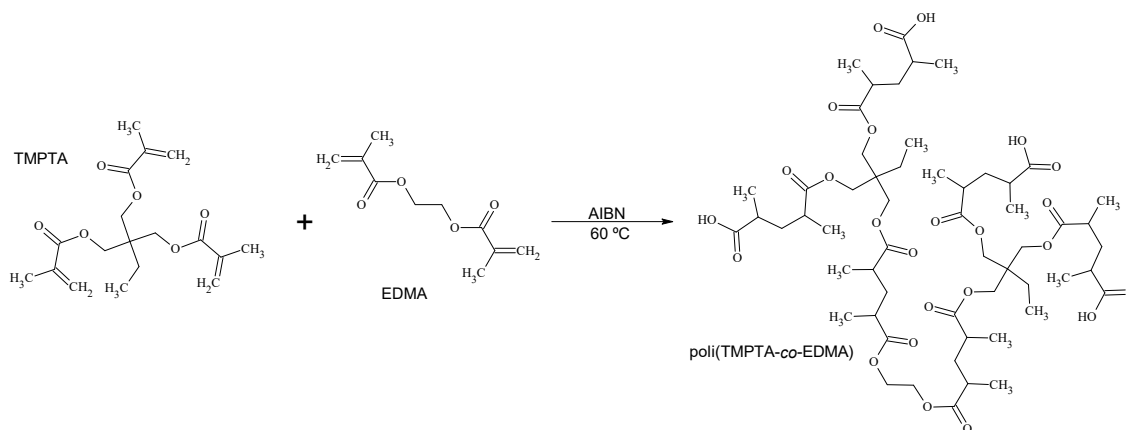
Como é observado na Figura 14, o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) na condição reacional #26 é uma partícula única de formato cônico, moldado pela ponteira descartável de 1000 μL , e que será empregada em extrações DPX, sem a necessidade de filtros de retenção como ocorre para sorventes particulados. Visto que o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26 apresentou características morfológicas adequadas para ser utilizado como sorvente DPX, os próximos estudos visaram a caracterização das propriedades morfológicas e estruturais do sorvente monolítico.

Na caracterização, além do sorvente na condição otimizada foram produzidos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) empregando apenas o isopropanol e a solução de PEG 10 % (m/v) em metanol nas reações #27 e #28, respectivamente, como único agente porogênico no processo de polimerização, para avaliação do efeito do solvente porogênico na polimerização.

3.3.2 Caracterização físico-química dos sorventes monolíticos de poli(TMPTA-co-EDMA)

A cadeia polimérica do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) é formada pela reação *in situ* por polimerização radicalar, termoativada dentro de um molde de ponteira de 1000 μL , contendo a mistura reacional composta pelo monômero estrutural (TMPTA), agente entrecruzante (EDMA), agentes porogênicos (sol. PEG 10 % m/v e isopropanol) e o iniciador radicalar (AIBN). A reação proposta é apresentada na Figura 15.

Figura 15. Reação de polimerização *in situ* do TMPTA e EDMA dentro da ponteira de micropipeta.



Fonte: Adaptado de (BAI *et al.*, 2014).

3.3.2.1 Avaliação da permeabilidade de líquidos pelos monolitos

Para a avaliação da permeabilidade de líquidos pelos monolitos, os monolitos foram deixados em água ultrapura por 12 h após o processo de extração Soxhlet. Este procedimento teve por finalidade evitar o inchamento ou compressão da estrutura no teste de permeabilidade com água. Foi fixado um volume de 3 mL de solvente, água ou metanol, com as ponteiros fixadas em um sistema manifold de 12 portas submetido a um vácuo brando (pressão interna 560 mmHg), cronometrando o tempo necessário para eluição do total do volume do solvente. Os resultados obtidos para os monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26 (sol. PEG 10 % m/v e isopropanol), #27 (isopropanol) e #28 (sol. PEG 10 % m/v), medidos em triplicata, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Medidas da vazão de solventes (água) pelos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	Vazão (mL min ⁻¹)			
#26 (PEG + isopropanol)	1,05	1,24	1,33	1,21 ± 0,14
#27 (isopropanol)	1,08	0,98	1,20	1,09 ± 0,11
#28 (PEG)	0,78	0,59	0,74	0,70 ± 0,10

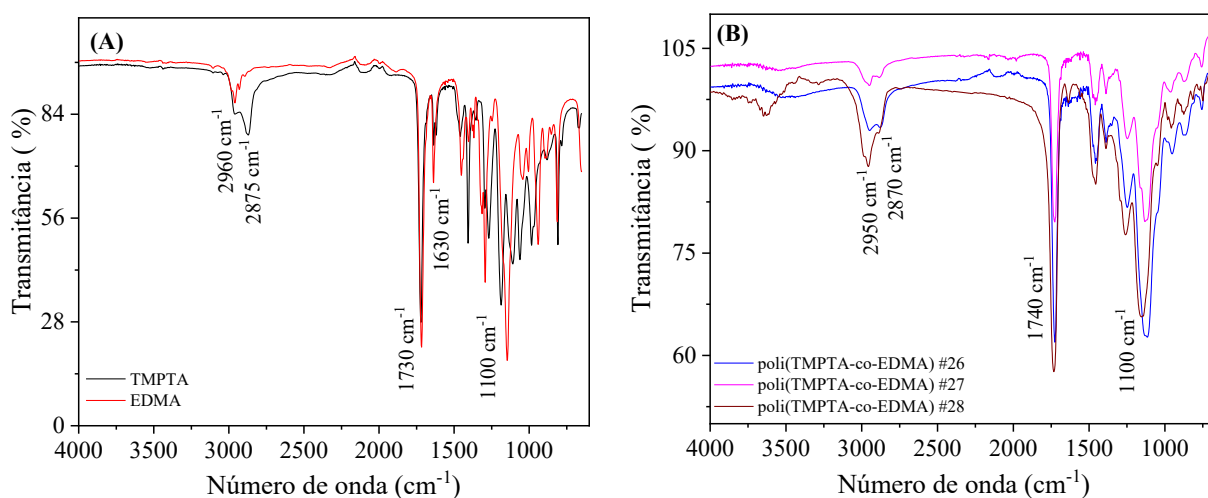
Apesar de não haver diferença estatística entre os valores de vazão obtidos para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com a mistura porogênica de sol. de PEG a 10 % m/v e isopropanol e daquele preparado com isopropanol (Tabela 12), foi mantida a preparação com a mistura de solventes por apresentar valores absolutos de vazão maiores. Segundo COURTOIS; BYSTRÖM; IRGUM (2006) e MANSOUR *et al.* (2020), a mistura entre a sol. do PEG e isopropanol diminui a solubilidade dos monômeros mais rapidamente durante a

polimerização, uma vez que a separação de fase ocorre logo após a formação dos primeiros núcleos de polimerização, fazendo com que as cadeias do monômeros tenham mobilidade para coalescer com os núcleos de polimerização. Com isso os núcleos aumentam de tamanho dando origem a glóbulos maiores, consequentemente macroporos e canais de maior tamanho.

3.3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta

As estruturas químicas dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho a partir da caracterização dos principais grupos funcionais presentes no material. O espectro FTIR dos monômeros precursores e dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Espectros FTIR dos (A) monômeros TMPTA e EDMA e (B) monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com os espectros FTIR do TMPTA e EDMA (Figura 16A) foi possível identificar grupos funcionais característicos das estruturas químicas desses monômeros. Podem ser observadas bandas em 2960 e 2875 cm⁻¹ características de vibração de alongamento assimétrico e simétrico da ligação C-H, respectivamente, além do estiramento da ligação –COO– na estrutura de TMPTA e EDMA em 1730 cm⁻¹. A banda em 1100 cm⁻¹ indica a presença da ligação C-O-C e em 1630 cm⁻¹ da ligação C=C dos monômeros (BAI *et al.*, 2014; ZHONG *et al.*, 2014). Já os espectros dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26 (PEG + isopropanol), #27 (isopropanol) e #28 (PEG) (Figura 16B) possuem similaridades entre si, sendo o esperado uma

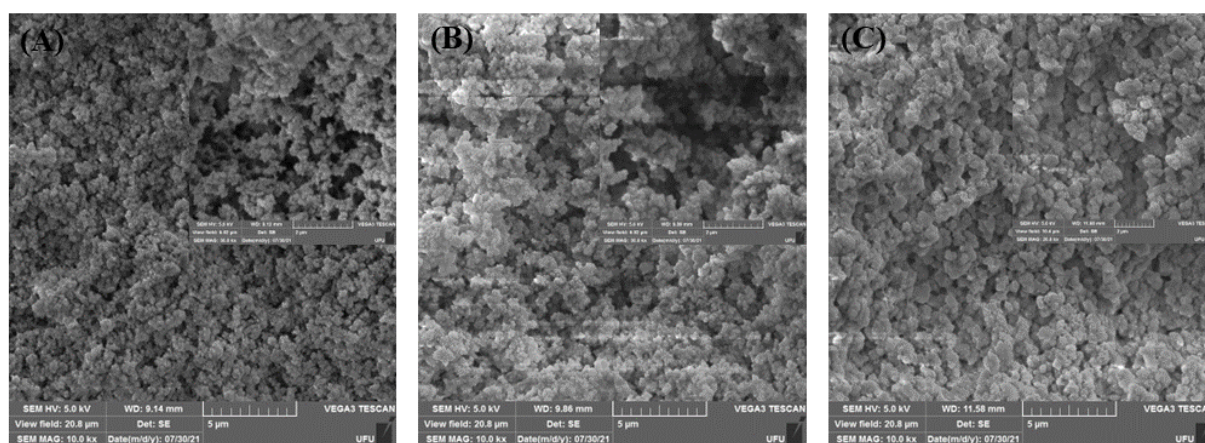
vez que o agente porogênico não faz parte da estrutura, não sendo observadas diferenças significativas nos espectros de infravermelho.

Apesar da similaridade entre os espectros dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 há diferenças importantes para os espectros dos monômeros. Para os monolitos é possível observar o alargamento das bandas, principalmente na região de impressão digital do espectro ($1500-1000\text{ cm}^{-1}$), esse alargamento se refere a repetição das unidades poliméricas e, conseqüentemente, do efeito sinérgico das vibrações de estiramentos alargando os sinais do espectro (HERRERA-GONZÁLEZ *et al.*, 2019). Outro aspecto que corrobora com esse resultado é a ausência do sinal em 1630 cm^{-1} referente a vibração da ligação $\text{C}=\text{C}$ dos monômeros, as quais foram rompidas para promover a polimerização radicalar das unidades monoméricas, confirmando a formação do poli(TMPTA-co-EDMA) (HERRERA-GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

3.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias são de grande relevância para avaliar a morfologia de materiais uma vez que elucida a estrutura microscópica dos sorventes. Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e as micrografias resultantes estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17. Micrografias eletrônicas de varredura dos monolitos (A) poli(TMPTA-co-EDMA) #26 (PEG + isopropanol), (B) #27 (isopropanol) e (C) #28 (PEG).



Fonte: Próprio autor.

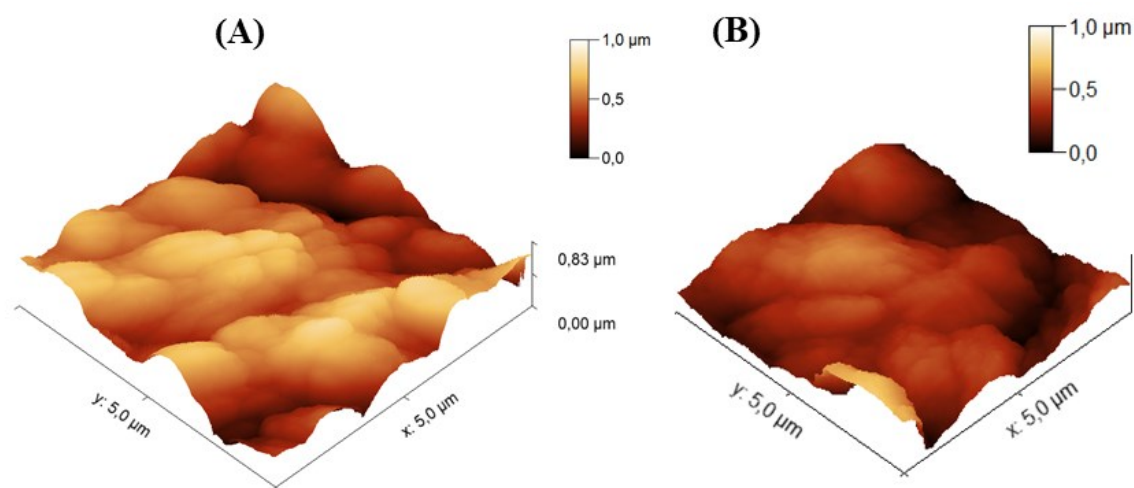
Observa-se nas micrografias de SEM da Figura 17 que os monolitos possuem estrutura globular, característicos de monolitos orgânicos, e a presença de aberturas porosas em sua estrutura, confirmando a obtenção de longos canais que provavelmente estão interconectados ao

longo da estrutura, o que tornou possível a permeabilidade do líquido. O monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, preparado com sol. PEG a 10 % m/v e isopropanol como porogênicos, foi o que apresentou estrutura mais porosa nas micrografias (Figura 17A), corroborando com os resultados de permeabilidade. O monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #27, preparado com isopropanol como porogênico (Figura 17B) também apresenta boa porosidade em sua estrutura, compatível com os resultados de permeabilidade de líquidos obtidos previamente. Já o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #28, preparado com a sol. PEG a 10 % m/v como porogênico (Figura 17C), apresenta estrutura globular como os demais, porém com os domínios sólidos bem compactados com poucas cavidades entre os glóbulos, corroborando com os resultados de permeabilidade de líquidos.

3.3.2.4 Microscopia de força atômica

A AFM consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda, que possibilita mapear propriedades mecânicas e físico-químicas superficiais dos materiais que as compõe. Uma de suas funções é avaliar o perfil topográfico da superfície dos materiais. As micrografias de força atômica da superfície dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26 e #27 estão apresentadas na Figura 18.

Figura 18. Micrografias AFM 3D dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparado com diferentes porogênicos, (A) #26 (sol. PEG 10 % e isopropanol) e (B) #27 (isopropanol).



De acordo com as imagens das topografias dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26 e #27 da Figura 18, pode-se observar que a superfície de ambos os monolitos são altamente irregulares (rugosas), e possuem longos desníveis e cavidades ao longo de toda sua extensão. A rugosidade do material pode ser explicada devido a presença dos núcleos sólidos globulares que

compõe a estrutura, enquanto as cavidades se referem a entrada de longos canais da estrutura monolítica, provavelmente que se interconectam com outros macroporos no interior da estrutura (CABRAL; BANDILLA; SKINNER, 2006). A diferença de coloração das topografias é atribuída a presença das entradas dos longos canais macroporosos na superfície dos monolitos. Esta porosidade, por sua vez, é de extrema importância para a permeabilidade de líquidos em processos de extração em fluxo contínuo, como se pretende para a DPX.

3.3.2.5 Área superficial específica e propriedades de poros

Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) foram analisados quanto às suas características de área superficial e porosidade a fim de avaliar as propriedades morfológicas dos sorventes. A área superficial foi obtida pelo método BET e a porosidade pelo método BJH (*Barrett-Joyner-Halenda*), em que as propriedades são avaliadas através de medidas da adsorção e dessorção de N₂ na superfície e nos poros dos monolitos dentro de uma faixa de pressões relativas. Os resultados obtidos para os monolitos poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 foram comparados e estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros dos sorventes monolíticos poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	S_(BET) (m² g⁻¹)	V_P (cm³ g⁻¹)	D_P (nm)
#26 (PEG + isopropanol)	49,68	0,2026	14,5
#27 (isopropanol)	81,44	0,2400	11,8
#28 (PEG)	12,15	0,0558	18,4

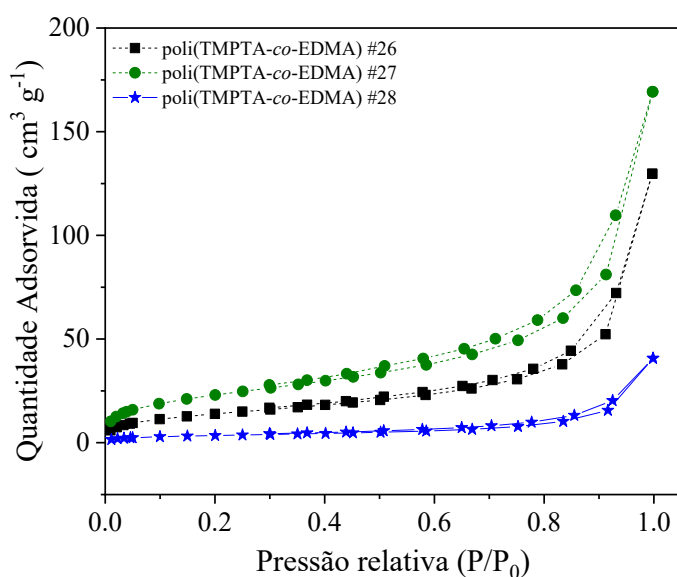
De acordo com os dados apresentados na Tabela 13, houve um aumento da área superficial do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) preparado com o isopropanol como solvente porogênico, quando comparado com o monolito otimizado com o uso de sol. PEG 10 % m/v e isopropanol como porogênicos. Este resultado está diretamente relacionado à porosidade do monolito e ao tamanho dos glóbulos formados durante o processo de polimerização. Quanto maior as unidades globulares da estrutura sólida e maior o diâmetro dos poros, menor a área superficial específica do monolito, conforme pode ser observado nos dados da Tabela 13. Além disso, a área superficial específica de um material tem forte contribuição de microporos, que deve estar em maior quantidade no monolito preparado apenas com o isopropanol como solvente porogênico, o que explicaria a redução do diâmetro médio dos poros e a maior área superficial específica BET.

Outro fato a ser considerado é a contribuição dos agentes porogênicos na porosidade dos monolitos, o isopropanol (estrutura menos volumosa) resultou no monolito com maior volume total de poros e com poros de menor diâmetro médio (11,8 nm), enquanto o monolito produzido com agente porogênico de estrutura mais volumosa (solução metanólica de PEG 10 %), monolito #28, resultou em menor porosidade total com poros de maior diâmetro médio (18,4 nm). O método empregado para determinação do volume total de poros, a partir da adsorção de gás N₂, apresenta limitação na medida de poros fora da faixa de 0,4 a 300 nm de diâmetro (YI *et al.*, 2020). Assim, eventuais macroporos formados pelo PEG, com diâmetros superiores a 300 nm, não serão medidos pela técnica empregada. O monolito #26, que empregou a mistura dos dois agentes porogênicos, apresentou valores intermediários aos monolitos que foram preparados com cada agente porogênico individualmente, indicando a influência da estrutura volumosa do agente porogênico na estrutura porosa de um monolito polimérico. O maior diâmetro médio de poros deste monolito em comparação ao preparado apenas com isopropanol é um indicativo da presença de um número maior de mesoporos ou macroporos, mais desejáveis para o processo de extração em fluxo.

Os resultados de área superficial específica e porosidade dos monolitos #26, #27 e #28 corroboram com os resultados de permeabilidade, na qual o monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #28 apresentou a menor vazão de líquidos, de 0,71 mL min⁻¹.

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ nos monolitos estão apresentadas na Figura 19. O perfil das isotermas de adsorção indicam algumas características morfológicas importantes dos materiais, como por exemplo o formato dos poros nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA).

Figura 19. Isotermas de adsorção de N₂ para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos: #26 (PEG + isopropanol), #27 (isopropanol) e #28 (PEG).



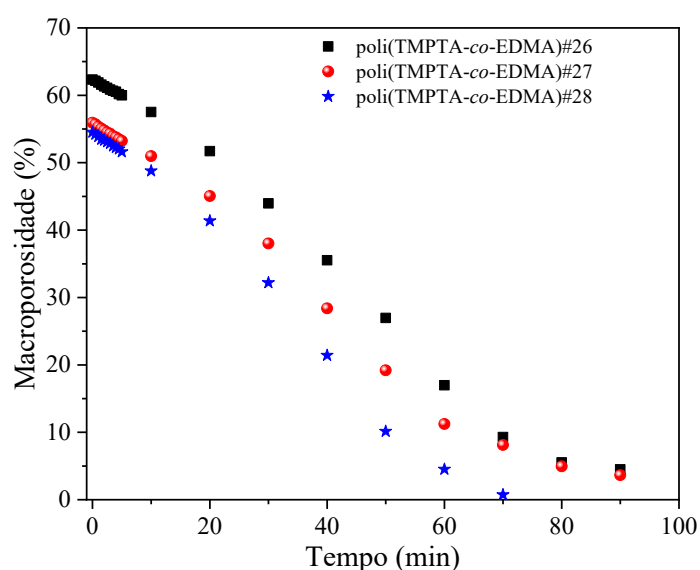
Fonte: Próprio autor.

O perfil das isotermas de adsorção e dessorção de N_2 apresentadas na Figura 19 é característico de isotermas do tipo II, de acordo com a classificação da IUPAC (SING, 1982). Este perfil de isoterma de adsorção é associado a materiais adsorventes macroporosos, indicando que os monolitos, apesar de apresentarem diâmetro médio de poros que os caracterizam como mesoporosos (2 a 50 nm), possuem uma forte contribuição de macroporos em sua estrutura, provavelmente não medidas por estarem acima de 300 nm de diâmetro, o que possibilita a permeabilidade de líquidos nas vazões de $>1,0 \text{ mL min}^{-1}$ como obtidas neste trabalho.

3.3.2.6 Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA)

Como o método de adsorção de N_2 não é capaz de medir macroporos na estrutura monolítica de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizada, a macroporosidade dos monolitos foi determinada pelo método de saturação de fluidos. O solvente escolhido para o estudo foi o butanol, pois este solvente não causa nenhuma mudança na estrutura monolítica durante a medida, sendo uma condição necessária para obtenção de resultados mais confiáveis por não inchar ou comprimir a estrutura (LU; LI, 2009; HOSSEN, 2020; DING, 2020). Normalmente se utiliza a água como fluido para medição da macroporosidade de materiais, porém a utilização de água nesse estudo levaria ao inchamento do monolito. Os valores de macroporosidade para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Perfil gravimétrico da macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos obtido pelo método de saturação de fluidos.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Figura 20, é possível observar um perfil da porcentagem de porosidade total similar para os monolitos preparados com diferentes solventes porogênicos. No entanto, não houve uma sobreposição das curvas, indicando que existe uma diferença de macroporosidade entre os monolitos. Diferentemente das isotermas de adsorção de gás, nesse estudo mede-se a porosidade total dos sorventes em relação aos macroporos presentes na estrutura monolítica. Para melhor avaliar a diferença entre os monolitos, os valores de porosidade obtidos das curvas da Figura 20 foram descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos, utilizando o método de saturação de fluidos, utilizando o seis pontos iniciais.

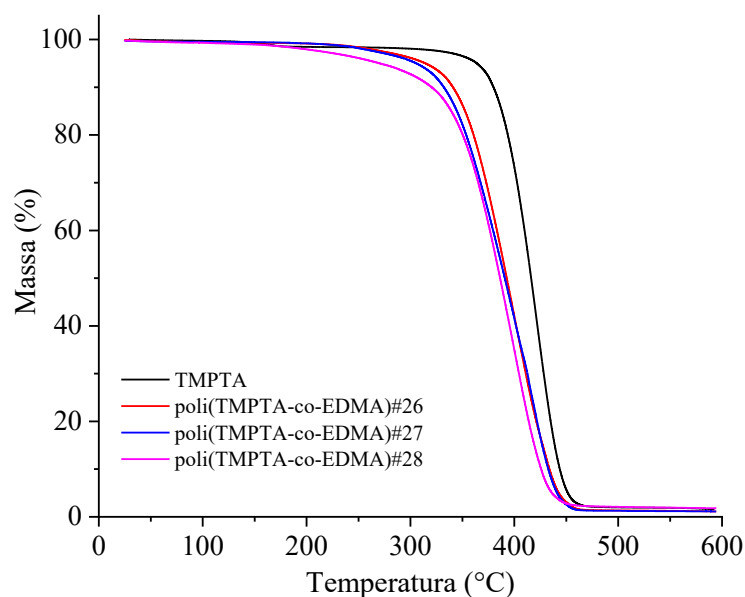
Monolitos	Porosidade (%)
Poli(TMPTA-co-EDMA) #26	65,8
Poli(TMPTA-co-EDMA) #27	62,9
Poli(TMPTA-co-EDMA) #28	54,6

De acordo com os dados de macroporosidade na Tabela 14, pode-se observar que os monolitos avaliados têm uma macroporosidade total superior a 50 % e o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, preparado com a mistura de solução de PEG a 10 % m/v em metanol e isopropanol, foi o que apresentou maior macroporosidade total, corroborando assim com os resultados de permeabilidade e adsorção de gás N₂ descritos anteriormente. Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #27 e #28 possuem um menores valores de macroporosidade, mas que ainda assim permite a fluidez de líquidos pelas suas estruturas.

3.3.2.7 Análise termogravimétrica

Para avaliar a estabilidade térmica dos monolitos foram realizadas medidas termogravimétricas (TG) dos monolitos preparados com diferentes solventes porogênicos. As curvas TG obtidas estão registradas na Figura 21.

Figura 21. Curvas TG para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos. Faixa de temperatura de 25 a 600 °C a com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as curvas TG da Figura 21, os monolitos possuem uma elevada estabilidade térmica e apresentam um único evento térmico relativo à decomposição da estrutura polimérica, que se inicia antes de 300 °C e finaliza em torno de 450 °C. Este resultado é uma confirmação da obtenção da estrutura monolítica polimérica sem a presença de resíduos monoméricos, que poderiam resultar em outros eventos térmicos antes de 300 °C (GALKA; KOWALONEK; KACZMAREK, 2014). Além disso, observa-se que os monolitos produzidos possuem uma menor estabilidade térmica quando comparados ao monômero (TMPTA). Isso pode ser devido a estrutura do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) ser formada pela ligação entre o monômero e o agente de entrecruzamento, abrindo a estrutura polimérica e possibilitando maior acesso de energia térmica para a decomposição do monolito. Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 preparados com diferentes solventes porogênicos possuem T_{onset} , temperatura do início do evento de degradação, de 349, 336 e 343 °C, respectivamente. Estas temperaturas de início de degradação térmica podem ser consideradas similares estatisticamente, indicando que o efeito do solvente nas propriedades térmicas dos monolitos é de pouca importância.

3.3.2.8 Densidade real

A fim de determinar a densidade das estruturas monolíticas porosas formadas, foi realizada a medida de densidade real dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, #27 e #28 pelo método

do picnômetro à gás hélio. Os valores de densidade real obtidos para os monolitos estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Densidades reais para os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) preparados com diferentes solventes porogênicos.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	Densidade real (g cm⁻³)
#26 (PEG + isopropanol)	0,9567 ± 0,0037
#27 (isopropanol)	0,8307 ± 0,0032
#28 (PEG)	0,8758 ± 0,0030

O monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) #26, preparado com a mistura da sol. de PEG e isopropanol como solventes porogênicos, apresentou a maior densidade real comparada aos monolitos #27 e #28, preparados com apenas um dos solventes porogênicos. Quando se utiliza o PEG como agente porogênico há uma contribuição ligeiramente maior no valor de densidade do que quando se utiliza isopropanol, de acordo com os dados da Tabela 15. Assim, observa-se que apesar dos agentes porogênicos não participarem da estrutura monolítica afetam a sua densidade. Comparadas às densidades dos monômeros, 1,11 g cm⁻³ para o TMPTA e 1,05 g cm⁻³ para o EDMA, os monolitos são consideravelmente menos densos devido à sua estrutura hierarquicamente porosa.

3.3.3 Teste de impressão molecular com vermelho do Congo

3.3.3.1 Estudo da macroporosidade dos monolitos impressos molecularmente

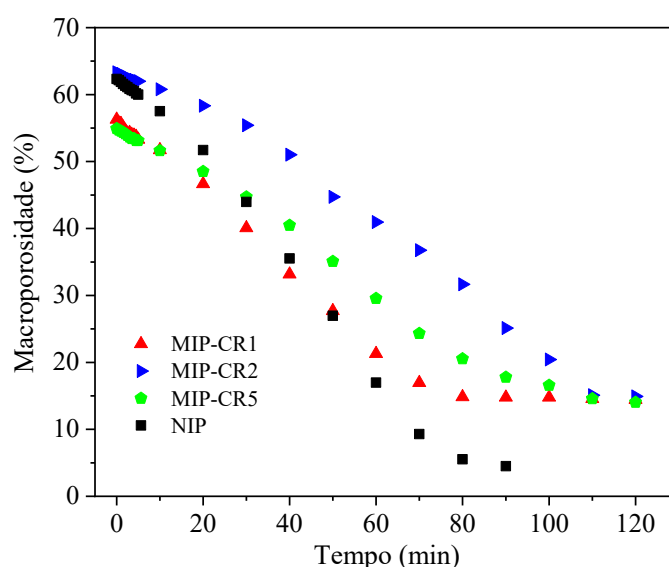
O monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26 preparado com a mistura de solventes porogênicos foi escolhido para o desenvolvimento do dispositivo DPX. Devido à baixa disponibilidade de padrão analítico da N-nitrosodimetilamina (NDMA), inicialmente a impressão molecular foi testada em um corante, o vermelho do Congo (CR, *Congo red*). A escolha do soluto teste foi em função da obtenção de uma solução colorida que possibilitaria medidas mais rápidas por espectroscopia de absorção molecular UV-vis e análise visual de descoloração da solução após a retenção nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA).

O processo de impressão molecular é capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento através da moldagem de moléculas, similares quimicamente aos analitos ou com os próprios analitos, na estrutura polimérica durante o processo de polimerização

in situ (LUO; WU; HUANG, 2023). Assim, o CR foi empregado como uma molécula sonda (*template*) para avaliar a potencialidade de modificação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) por impressão molecular. A polimerização foi realizada adicionando uma solução de CR em isopropanol, um dos agentes porogênicos, nas mesmas condições otimizadas da mistura porogênica para obtenção do monolito poli(TMPTA-co-EDMA) #26. Foram avaliadas três concentrações do CR no processo de impressão: $237,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $118,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $47,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo às razões molares TMPTA:CR de 0,6:1,0; 1,2:1,0 e 3,0:1,0, respectivamente, que foram identificados como MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5.

O efeito da adição da molécula do CR na formação da estrutura monolítica hierarquicamente porosa foi avaliada a partir da medida de macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) impressos molecularmente e para o monolito não impresso (NIP, *non-imprinted polymer*). Os resultados são apresentados na Figura 22.

Figura 22. Perfil gravimétrico da macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado e impresso molecularmente com vermelho do Congo pelo método de saturação de fluidos.



Fonte: Próprio autor.

Para os monolitos impressos molecularmente foi possível observar uma similaridade no comportamento da evaporação do fluido (butanol) no ensaio de macroporosidade, se estabilizando em aproximadamente 15 % de macroporosidade, indicando que o butanol não foi totalmente evaporado, provavelmente ficando retido em sítios deixados pela molécula do CR na estrutura. Os valores de macroporosidade obtidos das curvas da Figura 22 foram descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Macroporosidade dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) impressos molecularmente com vermelho do Congo, utilizando o método de saturação de fluidos e o butanol como solvente. $n = 3$.

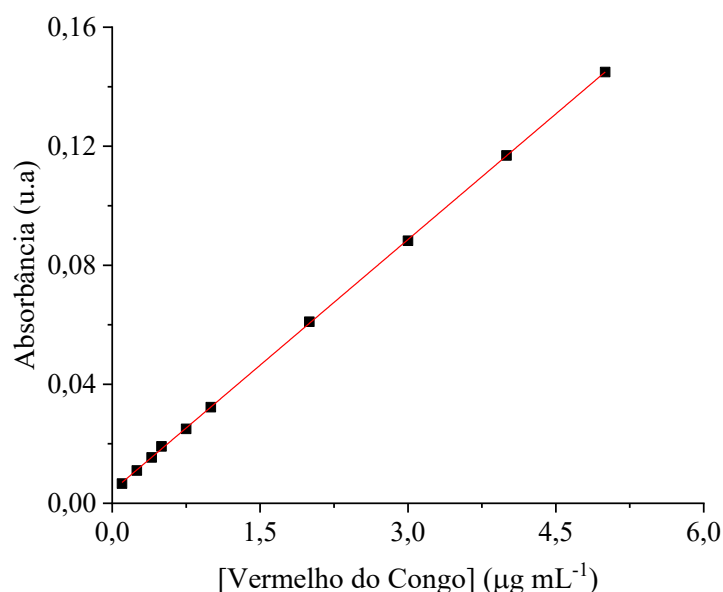
Monolito	Porosidade (%)
MIP-CR1	54,3
MIP-CR2	63,0
MIP-CR5	54,7
NIP	65,8

Os três monolitos MIP apresentaram porosidades médias inferiores ao monolito NIP, porém, superiores a 50 %. A presença da molécula modelo na mistura reacional levou a uma redução da macroporosidade provavelmente pela impressão dentro dos poros da estrutura monolítica reduzindo seu volume total (NDUNDA, 2020). O MIP-CR2 foi o que apresentou porosidade mais próxima do monolito sem impressão molecular. Apesar da diminuição da macroporosidade, não houve comprometimento da permeabilidade de água e de metanol pelo monolito em vazões similares às do NIP.

3.3.3.2 Estudo da adsorção de vermelho do Congo no MIP de poli(TMPTA-co-EDMA)

A interação entre o adsorvente (monolitos) e o adsorbato (VC) foi realizada pelo estudo da adsorção do CR com as superfícies dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) sem impressão molecular (NIP) e dos monolitos impressos molecularmente MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5. A quantificação do vermelho do Congo adsorvido nos monolitos foi realizada por espectroscopia de absorção na região visível, no comprimento de onda de 500 nm, que corresponde a máxima absorção do CR. Para tal, foi construída uma curva analítica para o CR, analisando espectrofotometricamente as soluções padrão de CR na faixa de concentrações de 0,10 a 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica obtida está apresentada na Figura 23.

Figura 23. Curva analítica do vermelho do Congo em soluções aquosas.



Fonte: Próprio autor.

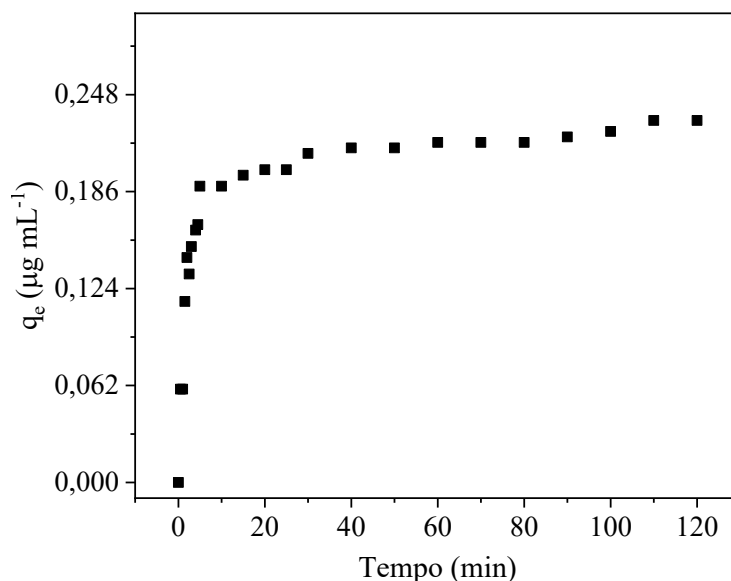
A partir das medidas de absorbância para as soluções de CR foi obtida a curva analítica a partir da regressão linear dos dados, obtendo um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999 e a equação de reta apresentada na Equação 3.

$$A = 0,00418 + 0,02815 * C_{CR}(\mu g mL^{-1}) \quad \text{Equação 3}$$

Em que: A: absorbância (u.a); C_{CR} : concentração da solução de vermelho do Congo em $\mu g mL^{-1}$.

Inicialmente, determinou-se o tempo de equilíbrio para a adsorção do CR nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP. Os monolitos foram deixados em contato sem agitação com uma solução de CR a $0,5 \mu g mL^{-1}$ sob diferentes tempos. A cada tempo de contato previamente estabelecido, a solução era analisada espectrofotometricamente e a quantidade adsorvida (q_e) de CR era determinada pela diferença entre concentração inicial e a concentração não adsorvida de vermelho do Congo. O tempo de equilíbrio entre o CR e o NIP foi determinado a partir da obtenção de concentração constante na solução do CR, conforme apresentado na Figura 24.

Figura 24. Tempo de equilíbrio para adsorção do vermelho do Congo no monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP.

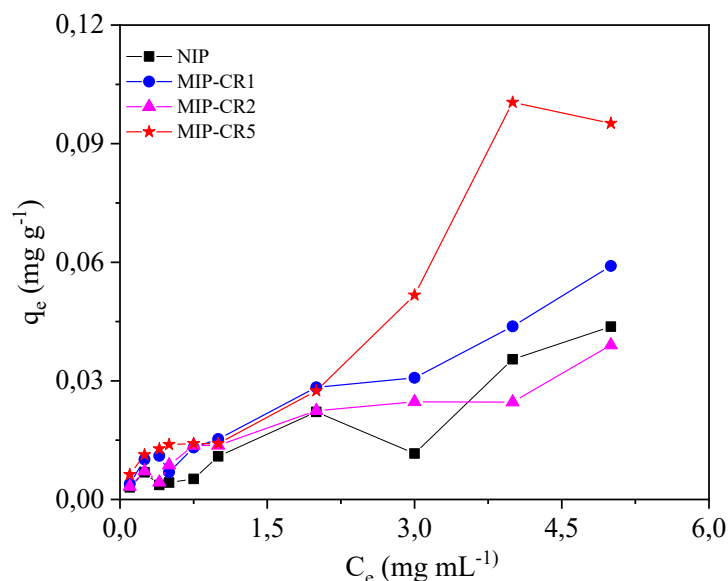


Fonte: Próprio autor.

O tempo necessário para a saturação da superfície dos monolitos com as moléculas de CR foi definido em 10 min. Após esse tempo não ocorre uma adsorção significativa do CR nos sítios dos monolitos, de acordo com a Figura 24. Porém, não se observa também uma estabilidade da adsorção do CR que caracterizasse efetivamente o equilíbrio com os sítios ativos do monolito até 120 min. Esta condição pode estar associada a permeabilidade lenta da solução de CR no interior da estrutura monolítica no modo de batelada, acessando contínua e lentamente os sítios ativos dos poros dos monolitos. Desta forma, o modo adequado de atuação dos sorventes monolíticos seja em processos de extração em fluxo contínuo, forçando a entrada de amostras e eluentes pela estrutura monolítica por meio de uma micropipeta.

A capacidade adsorptiva dos monolitos NIP e MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5 foram avaliadas a partir do contato dos monolitos com diferentes concentrações de CR por 10 min. As soluções foram analisadas espectrofotometricamente para determinar a quantidade de CR adsorvida (q_e) nos monolitos a partir da diferença entre as concentrações iniciais CR e a restante na solução após o contato com os monolitos. A relação entre a concentração do CR que permaneceu em solução na condição de equilíbrio (C_e) e a quantidade adsorvida pelos monolitos (q_e) foi registrada na forma de isotermas de adsorção que estão apresentadas na Figura 25.

Figura 25. Isotermas de adsorção do CR nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP, MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as isotermas da Figura 25, não é possível observar nenhuma tendência aparente que indicasse uma adsorção favorável ou desfavorável do CR nos monolitos (DIAS; CARMO, 2004). Assim, alguns modelos teóricos foram aplicados aos dados para extrair maiores informações sobre o processo de adsorção do CR nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) impressos ou não impresso. Os modelos mais utilizados são os propostos por Langmuir e Freundlich. O modelo de Langmuir baseia-se no movimento das moléculas do adsorbato pela superfície do adsorvente, de modo que, à medida que mais moléculas são adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície do adsorvente, desconsiderando a interação entre as moléculas adsorvidas (WANG; GUO, 2020). O modelo pode ser expresso pela Equação 4.

$$q_e = \frac{Q_{\text{máx}} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + Q_{\text{máx}} \cdot C_e} \quad \text{Equação 4}$$

Sendo: q_e : quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg g^{-1}); $Q_{\text{máx}}$: capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}); K_L : constante de interação de Langmuir (L mg^{-1}) e C_e : concentração do adsorbato no equilíbrio (mg L^{-1}).

O modelo de Freundlich consiste em uma distribuição logarítmica de sítios ativos, indicando que pode ocorrer interação entre as moléculas de adsorbato (adsorbato-adsorbato)

mesmo que essa interação não seja apreciável, admitindo assim a adsorção em multicamadas sobre a superfície do adsorvente. O q_e para esse modelo é calculado segundo a Equação 5.

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo: q_e : quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg g^{-1}); K_F : constante de interação de Freundlich (L mg^{-1}); C_e : concentração do adsorvato no equilíbrio (mg L^{-1}) e n : parâmetro empírico.

Ambos os modelos foram aplicados utilizando o modelo linearizado com intuito de definir os parâmetros teóricos de capacidade adsortiva dos monolitos a partir dos resultados obtidos experimentalmente. Um indicativo de que o sistema se ajusta a um determinado modelo é o valor do seu coeficiente de determinação (R^2). Os resultados obtidos a partir da aplicação dos modelos de Langmuir e Freundlich aos dados de adsorção do CR nos monolitos NIP e MIPs estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich para a adsorção de vermelho do Congo nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) NIP e MIP-CR1, MIP-CR2 e MIP-CR5.

Poli(TMPTA-co-EDMA)	Langmuir			Freundlich		
	R^2	$Q_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	K_L	R^2	K_F ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	N
NIP	0,073	0,178	0,066	0,770	0,010	1,51
MIP-CR1	0,583	0,286	0,083	0,986	0,029	1,17
MIP-CR2	0,748	0,457	0,046	0,910	0,013	1,64
MIP-CR5	0,054	0,118	0,224	0,874	0,024	1,43

A adsorção do CR nos monolitos não é bem descrita pelo modelo linearizado de Langmuir, no qual os valores de R^2 foram menores que 0,9, demonstrando assim que o modelo não foi bem ajustado. Para o modelo de Freundlich houve um melhor ajuste já que os valores de R^2 foram até maiores que 0,9. Desta forma, o processo de adsorção do CR nos monolitos devem ocorrer na forma de multicamadas. Esse comportamento não é incomum quando se trata de materiais porosos, devido as interações com sítios ativos dentro dos poros ou das cavidades deixadas pelo *template* do CR nos MIPs.

Os valores de n , obtidos no modelo de Freundlich, fornecem informações sobre o processo de adsorção, valores de $1 < n < 10$ indicam que o processo de adsorção do soluto no sorvente é favorecido. Neste caso, todos os monolitos resultaram em valores de $n > 1$, indicando uma adsorção favorável do CR nos monolitos. Era esperada uma diferença significativa entre o

poli(TMPTA-co-EDMA) NIP e os MIPs devido a impressão molecular da molécula do CR. Os valores de K_F do modelo de Freundlich fornecem informações aproximadas da capacidade adsortiva dos monolitos e como pode ser observado na Tabela 17, os MIP apresentaram maior capacidade adsortiva que o monolito NIP. O MIP-CR1, que empregou a maior concentração de vermelho do Congo no processo de impressão molecular, apresentou uma capacidade de adsorção quase 3 vezes maior que o NIP, indicando um bom fator de impressão molecular do CR neste monolito.

3.4 Conclusões parciais

O sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA) apresentou rigidez, alta porosidade e boa permeabilidade de fluidos e capaz de imprimir moléculas em sua estrutura, características desejadas para a aplicação na extração DPX. O sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA) otimizado consistiu na proporção de mistura monomérica:mistura porogênica de 20:80 % (m/m), em que a mistura monomérica foi constituída de 30:70 TMPTA:EDMA, enquanto a mistura porogênica de 30:70 de solução metanólica de PEG a 10 % (m/v):isopropanol. Este monolito apresentou boa permeabilidade de líquidos, estabilidade térmica e estrutura hierarquicamente porosa.

Através da caracterização estrutural e morfológica foi possível confirmar a estrutura monolítica formada. Os monolitos obtidos apresentaram alta porosidade confirmada através de micrografias, isothermas de adsorção e teste de macroporosidade, imprescindível para uso como sorvente monolítico no processo de extração DPX em fluxo contínuo.

A impressão molecular de um soluto teste nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA) também apresentou potencialidade como estratégia de melhorar a seletividade no processo de extração, resultando em um aumento da capacidade adsortiva do sorvente monolítico MIP de quase três vezes a capacidade do monolito não impresso.

CAPÍTULO 4

FUNCIONALIZAÇÃO DO SORVENTE

MONOLÍTICO

4.1 Introdução

O monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) apresentou características físico-químicas e morfológicas adequadas para o processo DPX, no entanto, para a impressão molecular da NDMA, a estrutura molecular não possui sítios de interação capazes de formar o complexo com o NDMA. A NDMA é um composto altamente hidrofílico com LogP igual a -0,57 diferentemente da molécula do vermelho do Congo que apresenta LogP de 3,57 ou LogD de 2,36 (entre pH 5,5 a 7,4) (PUBCHEM, 2024; CHEMBASE, 2024). Desta forma, o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA) preparado sob condições otimizadas foi submetido à uma funcionalização com a adição do monômero de ácido metacrílico (MAA) na mistura reacional antes da polimerização. A escolha do MAA é baseada no amplo uso na preparação de polímeros molecularmente impressos (MIPs) por fornecer sítios de interação para moléculas-modelo mais polares (SHI *et al.*, 2007). O resultado dessa modificação foi a formação da estrutura monolítica denominada de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

Em seguida, como continuidade do processo de funcionalização do monolito realizou-se a impressão molecular empregando como molécula-molde a própria NDMA. Nesse contexto, foram desenvolvidos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) MIP e NIP para avaliação da efetividade da impressão molecular. Após o processo de funcionalização por impressão molecular, o sorvente foi empregado no processo DPX, otimizando as principais variáveis do método para garantir eficiência e seletividade da extração de NDMA de amostras líquidas e quantificando os extratos obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*). O método DPX para determinação de NDMA de amostras líquidas otimizado foi validado conforme as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) (ICH, 2023).

4.2 Metodologia

4.2.1 Preparação dos monolitos poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)

Para avaliar a funcionalização do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA) utilizando a impressão molecular (MIP), foi adicionada à mistura reacional um segundo monômero funcional, o ácido metacrílico (MAA). O MAA foi adicionado à mistura reacional com intuito de garantir a estrutura monolítica sítios de interação mais hidrofílicos, possibilitando a interação e impressão molecular da N-nitrosodimetilamina (NDMA). O monolito obtido, o poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA), foi preparado seguindo as condições otimizadas para o poli(TMPTA-co-EDMA), no entanto, substituindo os 6 % de TMPTA (Tabela 5) por 3 % de TMPTA e 3 % de MAA na mistura reacional. A Tabela 18 apresenta as condições de preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

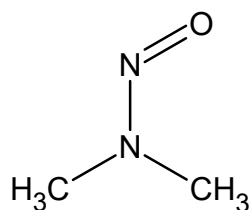
Tabela 18. Condições de preparação do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA), utilizando uma solução metanólica de 10 % (m/v) de PEG e isopropanol como solventes porogênicos.

POLI(TMPTA-CO-EDMA-CO-MAA)	AIBN	TMPTA	MAA	EDMA	PEG (10%)	IsopOH
NIP	1 %	3,0 %	20 % 3,0 %	14,0 %	80 % 24,0 %	56,0 %

4.2.2 Impressão molecular do NDMA nos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)

Com o propósito de avaliar a eficácia da impressão molecular (MIP) da NDMA na estrutura monolítica, optou-se pela utilização do padrão da própria N-nitrosodimetilamina como molécula-modelo (*template*). A NDMA é um produto de degradação de alguns APIs e recentemente encontrada em medicamentos para hipertensão, diabetes e azia (WHITE, 2020), podendo também ser encontrada em alguns alimentos processados (EFSA *et al.*, 2023). Dessa forma, a escolha da própria molécula da NDMA (Figura 26) como *template* visa fornecer ao monolito o máximo de seletividade para esta nitrosamina em meio a matrizes tão complexas como a de alguns medicamentos e ou de alimentos.

Figura 26. Estrutura molecular da N-nitrosodimetilamina (NDMA).



A impressão da NDMA no sorvente monolítico foi avaliada em três concentrações diferentes. A NDMA foi dissolvida em isopropanol, mantendo inalterada a composição dos agentes porogênicos otimizada na preparação dos sorventes monolíticos, conforme definido para o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA). As concentrações de NDMA estudadas e sua relação molar com o monômero de MAA estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Condições para impressão molecular da NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

POLI(TMPTA-CO-EDMA-CO-MAA)	C_{NDMA} (g mL⁻¹)	Razão molar MAA:NDMA (mol:mmol)
MIP 1	7,65	2,56:1,00
MIP 2	15,30	1,28:1,00
MIP 4	30,61	0,64:1,00

4.2.3 Caracterização dos monolitos de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA)

Os monolitos preparados com (MIP) e sem (NIP) impressão molecular foram caracterizados por FTIR e SEM seguindo os procedimentos descritos nas seções 3.2.2.2 e 3.2.2.3, respectivamente, avaliando se houve mudanças na estrutura e ou na morfologia após a adição no monômero MAA no monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) NIP e nos monolitos impressos molecularmente com diferentes concentrações de NDMA: MIP1, MIP2 e MIP4.

4.2.4 Otimização do método DPX com poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) para extração de NDMA de amostras líquidas

O método de extração proposto neste trabalho pode ser considerado uma variante do método DPX proposto originalmente, uma vez que o sorvente não é particulado e o processo de interação do sorvente com os analitos se dará em fluxo, um modo DPX não dispersivo. Ou seja, a amostra e o eluente serão succionados e dispensados para dentro da ponteira com o sorvente monolítico, sem manter o líquido aprisionado na ponteira e sem succionar ar para aumento do contato com o sorvente.

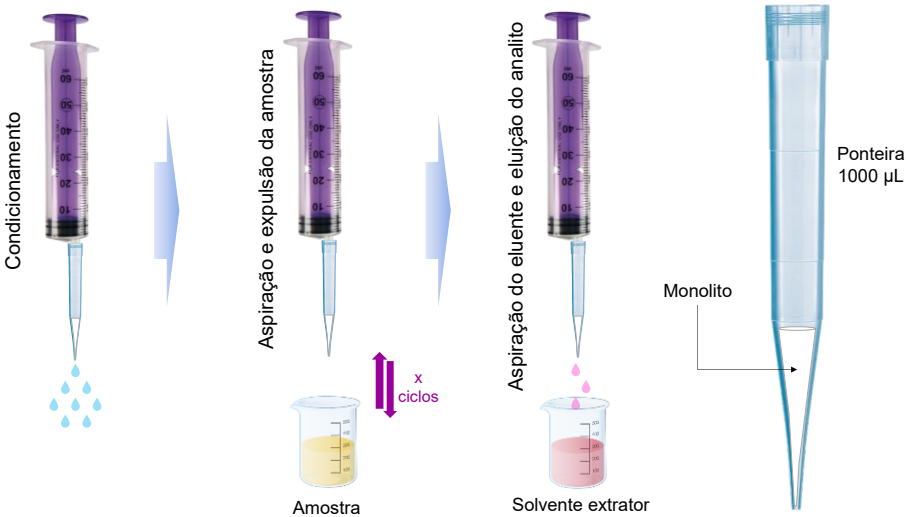
Neste trabalho, os sorventes monolíticos, preparados com e sem impressão molecular, foram aplicados na extração da NDMA de água ultrapura, visando a otimização univariada das principais variáveis do processo DPX em fluxo. Foram submetidos à otimização: o volume de amostra, o número de ciclos de sucção da amostra pelo sorvente monolítico, o uso de aditivos na amostra, o tipo e o volume de eluente foi fixado em 500 µL, o número de ciclos do eluente. Os níveis avaliados dessas variáveis estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros estudados na otimização do método DPX empregando o sorvente monolítico poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) na extração de NDMA de amostras líquidas.

	Níveis estudados			
Volume amostra (mL)	1,5	2,0	3,0	
Ciclos de amostra	1	2	3	4
Aditivo (NaCl, % m/v)	10	20	30	40
Tipo de eluente	Metanol	Acetonitrila	Etanol	
Ciclos de eluente	1	2	3	4

O processo de extração DPX não dispersivo consistiu das seguintes etapas: (1) condicionamento do sorvente monolítico dentro da ponteira com a aspiração e dispensa de 1 mL de água ultrapura; (2) aspiração e dispensa do volume da amostra através do sorvente monolítico; (3) aspiração e dispensa do volume de eluente. A ponteira contendo o sorvente monolítico foi conectada a uma seringa de poli(propileno) de 50 mL e a vazão de sucção e dispensa dos líquidos foi de aproximadamente 1,13 mL min⁻¹. Este procedimento está esquematizado na Figura 27.

Figura 27. Esquematização do processo de extração DPX em fluxo, empregando sorvente monolítico.



Fonte: (CASTILHO, 2023)

4.2.5 Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Para a determinação do NDMA, os extratos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 SE (Tóquio, Japão). A aquisição e processamento de dados foi realizada pelo software LabSolutionsTM. A análise foi executada empregando uma coluna capilar 5H-Rtx-Wax, com dimensões de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária de poli(etilenoglicol) de 20 M (massa molar média de 20.000 g mol⁻¹). A eluição, empregando como gás de arraste hélio a 3,0 mL min⁻¹, foi realizada no modo de programação de temperatura, ajustando a temperatura inicial em 70 °C por 4 min, seguida por um aumento de 20 °C min⁻¹ até 110 °C, totalizando 6 min de análise. A temperatura do injetor foi mantida em 200 °C no modo split com razão de divisão de fluxo de 1:5. O volume de injeção dos extratos foi de 1 µL. As configurações do espectrômetro de massas foram estabelecidas com temperaturas de fonte e interface 240 °C e 250 °C, respectivamente. A aquisição de dados foi obtida no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 25 a 80, monitorando as razões massa/cargas (SIM, *selected ion monitoring*) de 74, 55, 43, 42 e 41 m/z.

Para correção de potenciais erros de injeção, foram adicionadas a todas as soluções padrão e extratos o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol ou isopentanol) como padrão interno, mantido a uma concentração de 0,1 µL L⁻¹.

4.2.6 Validação do método DPX com monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente com NDMA

A validação do método DPX-GC-MS para a determinação de NDMA de amostras líquidas, empregando sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente foi realizada seguindo o protocolo recomendado pelo ICH, documento Q2(R2) (ICH, 2023). Os parâmetros analíticos do método que foram validados: seletividade, linearidade, faixa de trabalho (faixa linear), limite de quantificação, precisão e exatidão.

4.2.6.1 Seletividade

A seletividade do método é a habilidade de medir, de maneira inequívoca, o analito na presença de componentes presentes no extrato que não são de interesse na análise. Esta característica foi

analisada por meio da comparação entre o cromatograma de um extrato de uma amostra em branco, isenta da presença de NDMA, e o cromatograma do extrato de uma amostra fortificada com NDMA, sob as condições otimizadas do método DPX.

4.2.6.2 Faixa de trabalho e linearidade

A linearidade do método DPX-GC-MS para determinação de NDMA em amostras líquidas foi obtida a partir da análise de soluções padrões de NDMA em diferentes concentrações: 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por CG-MS nas condições de análise otimizadas. As áreas de pico para o NDMA foram registradas e uma curva analítica foi construída a partir da relação entre as concentrações de NDMA e as áreas de pico no cromatograma, método do padrão externo. A menor concentração de NDMA medida instrumentalmente de forma repetitiva foi definida como o limite de quantificação instrumental e a primeira concentração da curva analítica. Para correção de eventuais erros de injeção, foi adicionada a cada solução padrão de NDMA, 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de isopentanol como padrão interno (IS, *internal standard*). As razões entre áreas dos picos da NDMA e do IS foi registrada em função da concentração das soluções padrão de NDMA, para construção de uma curva analítica pelo método do padrão interno. O coeficiente de regressão linear (r) obtido a partir das regressões lineares para as curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo e padrão interno foi parâmetro para avaliação da linearidade do método DPX-GC-MS. De acordo com o protocolo do ICH, o critério de aceitação para que o método seja considerado linear é de $r > 0,99$.

4.2.6.3 Limite de quantificação instrumental (LoQ_{INST})

O limite de quantificação instrumental (LoQ_{INST}) foi determinado através da injeção consecutiva de soluções padrão de NDMA no cromatógrafo a gás, diluídas a partir da solução de trabalho a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, o LoQ_{INST} foi definido como a menor concentração de NDMA que resultou em um pico com área repetitiva, com desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*) $< 20 \%$, de 5 injeções sequenciais.

4.2.6.4 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão do método DPX-GC-MS para determinação de NDMA em amostras líquidas foram avaliadas a partir de ensaios de adição e recuperação do NDMA de

amostras de água. A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade (medidas realizadas de forma idêntica em um mesmo dia pelo mesmo analista) e a precisão intermediária (medidas realizadas de forma idêntica em dias distintos pelo mesmo analista). O método DPX com o sorvente de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente foi aplicada a amostras de água ultrapura fortificadas com uma solução padrão do NDMA em três níveis: $5 \times \text{LoQ}_{\text{INST}}$, $10 \times \text{LoQ}_{\text{INST}}$ e $15 \times \text{LoQ}$, realizadas em triplicatas e em três dias distintos. Os extratos obtidos foram analisados por GC-MS. A repetibilidade e a precisão intermediária do método foram expressas pelos desvios padrão relativos (RSD) das recuperações do NDMA em um mesmo dia e em três dias distintos, respectivamente, para as três concentrações avaliadas. A exatidão do método foi expressa pela porcentagem de recuperação de NDMA obtida em cada nível de concentração estudado.

4.2.7 Fator de impressão molecular do NDMA

A efetividade da impressão molecular do NDMA no sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA), avaliada em três concentrações distintas da molécula-modelo, foi determinada por ensaios de adição e recuperação do NDMA em amostras líquidas, utilizando o método DPX com o NIP e os MIPs produzidos. O fator de impressão (IF, *imprinting factor*) foi o parâmetro usado para avaliar a efetividade da impressão do NDMA nos monolitos (NDUNDA, 2020). O IF foi calculado a partir da Equação 6.

$$IF = \frac{\%R_{MIP}}{\%R_{NIP}} \quad \text{Equação 6}$$

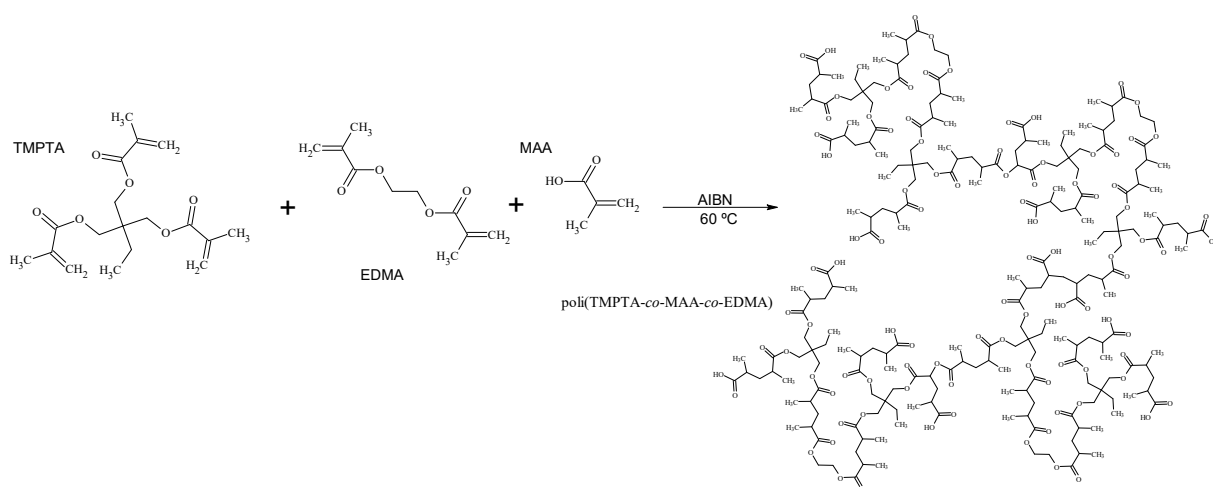
Em que: IF: é o fator de impressão do NDMA; $\%R_{MIP}$: porcentagem de recuperação do NDMA empregando o MIP, $\%R_{NIP}$: porcentagem de recuperação do NDMA empregando o NIP.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)

A incorporação do MAA na estrutura monolítica previamente otimizada de poli(TMPTA-co-EDMA) teve por objetivo a formação do complexo com a NDMA na etapa de impressão molecular, uma vez que o TMPTA e o EDMA não possuem sítios que possibilitasse uma interação efetiva com a nitrosamina. Os sítios ácidos do MAA podem se ligar mais fortemente à molécula do NDMA durante o processo de polimerização (LI *et al.*, 2019), deixando uma estrutura de reconhecimento molecular nos monolitos, garantindo a seletividade necessária para retenção do NDMA no processo DPX. A reação proposta para a incorporação do MAA na estrutura monolítica está apresentada na Figura 28.

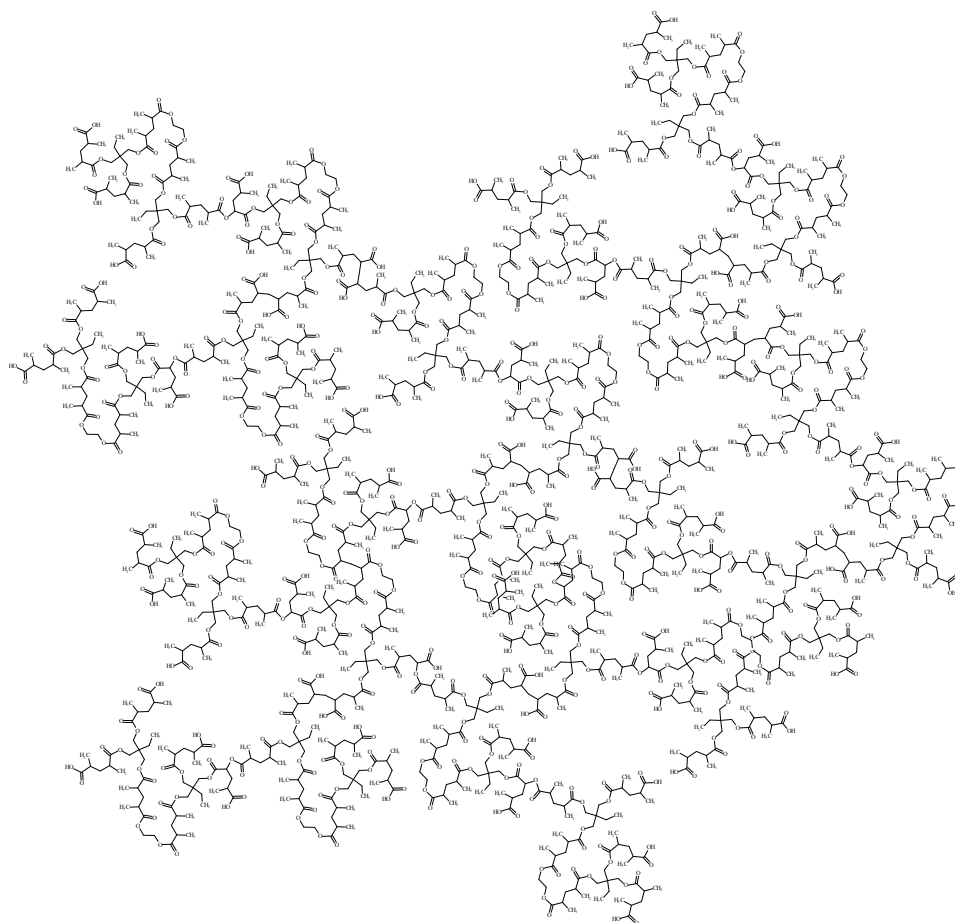
Figura 28. Reação de polimerização de TMPTA, MAA e EDMA, iniciada por AIBN, empregando sol. 10 % m/v de PEG 1000 e isopropanol como solventes porogênicos.



Fonte: Próprio autor.

Espera-se que o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) formado apresente estrutura hierarquicamente porosa (cavidades interconectadas) na sua fase polimérica, conforme ilustrado na Figura 29, possibilitando um bom fluxo de líquidos com baixa pressão de retorno. Essa porosidade é proveniente do entrecruzamento da estrutura polimérica com o EDMA e pela presença dos solventes porogênicos: solução metanólica de 10 % m/v de PEG e isopropanol.

Figura 29. Estrutura polymerizada do sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).



Fonte: Próprio autor.

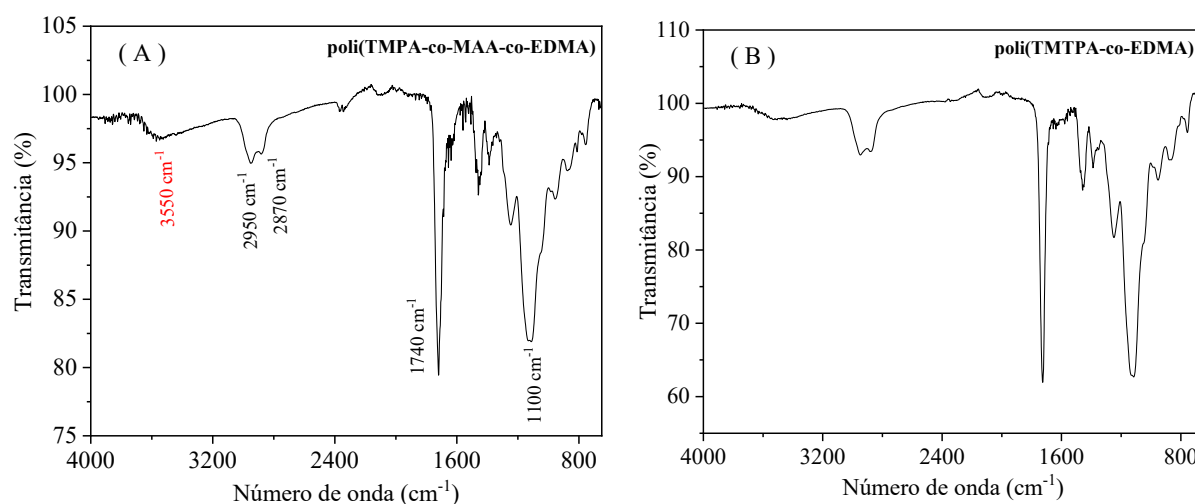
4.3.2 Caracterização dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)

A avaliação estrutural e morfológica dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) foi realizada por FTIR e SEM. Esperava-se que a inclusão do MAA não provocasse mudanças de forma significativas nas propriedades morfológicas do sorvente, uma vez que a quantidade adicionada substituiu uma quantidade equivalente de TMPTA e representou apenas 3 % da mistura reacional.

4.3.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O ácido metacrílico apresenta em sua estrutura um grupo carboxílico que o difere do TMPTA e do EDMA e que foi o responsável pela escolha deste monômero para a funcionalização do poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA). A alteração estrutural do monolito com a inserção do monômero de MAA foi avaliada por espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho. O espectro FTIR de um pequeno pedaço do monolito está registrado na Figura 30.

Figura 30. Espectro de absorção no infravermelho dos monolitos de (A) poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) e (B) poli(TMPTA-co-EDMA).



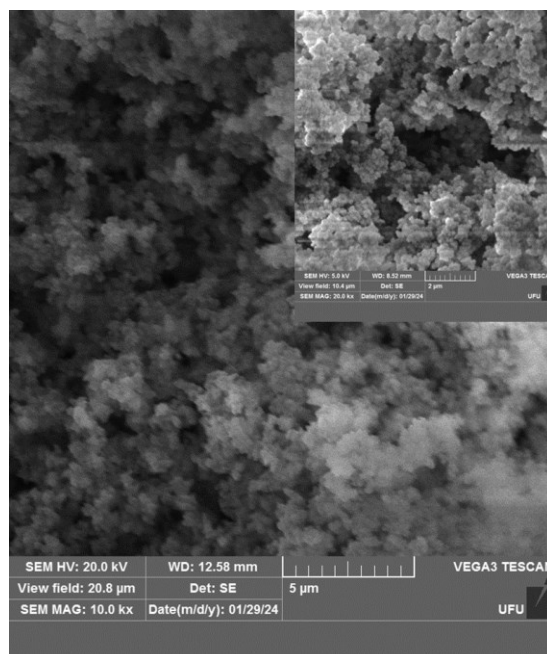
Fonte: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 30, os espectros dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) e poli(TMPTA-co-EDMA) apresentam as mesmas atribuições de banda, apesar da banda registrada em 3550 cm^{-1} resultar em uma intensidade ligeiramente maior no monolito com MAA. Esta banda é atribuída a vibração de grupos hidroxilas -O-H, que pode ser resultado da incorporação do MAA na estrutura monolítica. Como a quantidade empregada de MAA é relativamente pequena no processo de polimerização, a banda não apresenta um sinal que se diferencia tão significativamente do monolito sem o MAA. Observa-se de forma similar ao espectro do poli(TMPTA-co-EDMA), Figura 30B, o alargamento dos sinais na região de $1500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ e a ausência do sinal característico de estiramento da ligação C=C em 1630 cm^{-1} no monolito de poli(TMPTA-co-MAA-co-EDMA). Desta forma, observa-se que estruturalmente por FTIR não houve alteração significativa na estrutura monolítica após a inclusão do MAA.

4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura para avaliação da sua estrutura morfológica após incorporação do MAA. Uma micrografia representativa do poli(TMPTA-co-MAA-co-EDMA) está apresentada na Figura 31.

Figura 31. Micrografia SEM representativa dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) com ampliação de 10 kx. Em destaque no canto superior direito: a mesma micrografia ampliada 20 kx.



Fonte: Próprio autor.

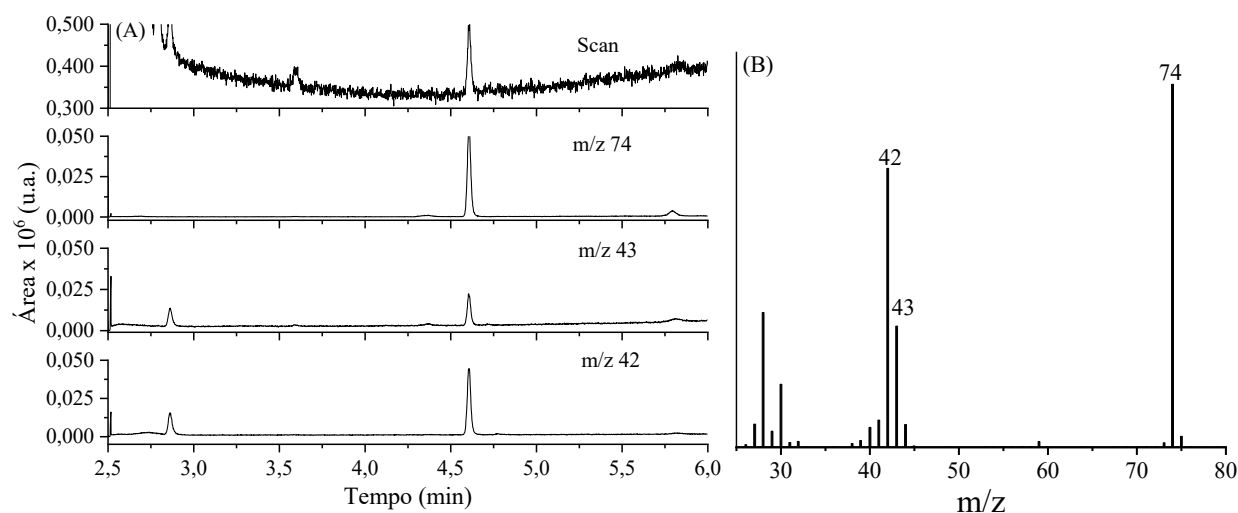
De acordo com a micrografia da Figura 31, os monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) não apresentaram mudança no formato dos glóbulos e nas aberturas (cavidades) entre as estruturas globulares de forma significativa, quando comparado ao monolito poli(TMPTA-co-EDMA). Este resultado é um indicativo de que a adição do monômero de MAA não afetou morfologicamente a formação monolítica polimérica. Ambos os materiais possuem características morfológicas, visualizadas nas micrografias de SEM, que os definem como estruturas macroporosas, com potencialidade para aplicação como sorventes em um processo de extração DPX em fluxo.

4.3.3 Definição do método de análise por CG-MS

A definição do método de análise para quantificação do NDMA nos extratos foi realizada por GC-MS. A escolha da cromatografia gasosa foi baseada na volatilidade do NDMA, K_H de $1,0 \times 10^{-6} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (PUBCHEM, 2024), e na possibilidade de confirmação da identidade do pico em meio a amostras complexas. Uma solução padrão de NDMA a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizada para a definição das condições de análise por CG e dos fragmentos a serem monitorados no MS, no modo SIM. As razões massa/carga foram analisadas na faixa de m/z de 25 a 80. O pico do NDMA foi registrado cromatograma de íons totais e monitorado nas m/z de 74, 43 e 42. O pico do padrão

interno foi registrado no cromatograma de íons totais (TIC, *total ion chromatogram*) e monitorado no modo SIM na razão m/z de 55. Os cromatogramas e o espectro de massas correspondente à molécula de NDMA estão apresentados na Figura 32.

Figura 32. (A) Cromatogramas da solução padrão de NDMA, na concentração de 50 ng mL^{-1} , no modo TIC e no SIM, monitorando as m/z 74, 43 e 42 e (B) espectro de massas obtido para o pico do NDMA, registrado em 4,62 min.



Fonte: Próprio autor.

Os cromatogramas apresentados na Figura 32A revelam uma diferença na intensidade do pico de NDMA ($t_R = 4,62 \text{ min}$) entre os modos TIC e SIM. No modo TIC, observa-se uma intensidade de sinal superior para o NDMA, porém, há uma maior intensidade de ruído, comprometendo a medida de concentrações mais baixas de NDMA. Os cromatogramas no modo SIM indica maior intensidade do pico do NDMA no modo SIM com m/z de 74, seguido por m/z 42 e 43. O espectro de massas (Figura 32B) para o pico atribuído ao NDMA é comparável com o registrado na biblioteca do espectrômetro de massas e também na base de dados do NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (WEBBOOK, 2023). Neste estudo, a quantificação da NDMA foi realizada utilizando o cromatograma de íon selecionado na m/z de 74.

4.3.4 Otimização do método de extração DPX em fluxo de NDMA de amostras líquidas

O método DPX proposto para a extração em fluxo de NDMA de amostras aquosas, empregando o monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente com NDMA, foi otimizado com relação às principais variáveis do processo: tipos de eluente, ciclos de

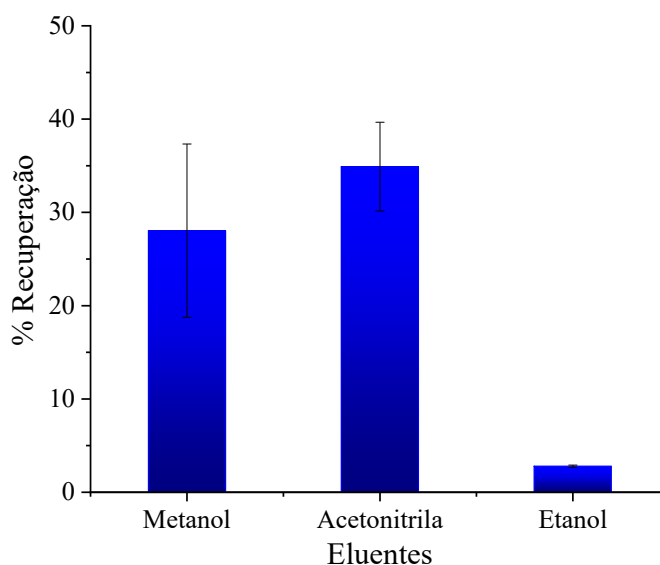
amostra, uso de aditivos, ciclos de eluente, volume de amostra. A vazão de líquidos (amostra e eluente) pelos monolitos foi mantida constante, em $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.4.1 Tipo de eluente

Para a otimização do método DPX, inicialmente foram avaliados diferentes eluentes no processo de extração, considerando aqueles com polaridade mais próxima do NDMA ($\text{LogP } -0,57$). Nesse sentido, os solventes avaliados na recuperação do NDMA do sorvente de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) NIP e MIP foram o metanol ($\text{LogP } -0,77$), acetonitrila ($\text{LogP } -0,34$) e etanol ($\text{LogP } -0,27$), (ABDOLLAHI; KARBALAEI-HEIDARI, 2014). Uma solução padrão de NDMA a 50 ng mL^{-1} foi utilizada nos ensaios de adição e recuperação. Nesta etapa, foram fixados o volume de amostra em $1,00 \text{ mL}$, 1 ciclo de aspiração e dispensa da amostra, $500 \text{ }\mu\text{L}$ de eluente orgânico e 1 ciclo de aspiração e dispensa da amostra. As porcentagens de recuperação obtidas para os três eluentes avaliados estão apresentadas na Figura 33.

Figura 33. Porcentagem de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo, empregando o sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente e diferentes eluentes.

Condições de extração: volume de amostra $1,0 \text{ mL}$; volume de solvente $500 \text{ }\mu\text{L}$.



Fonte: Próprio autor.

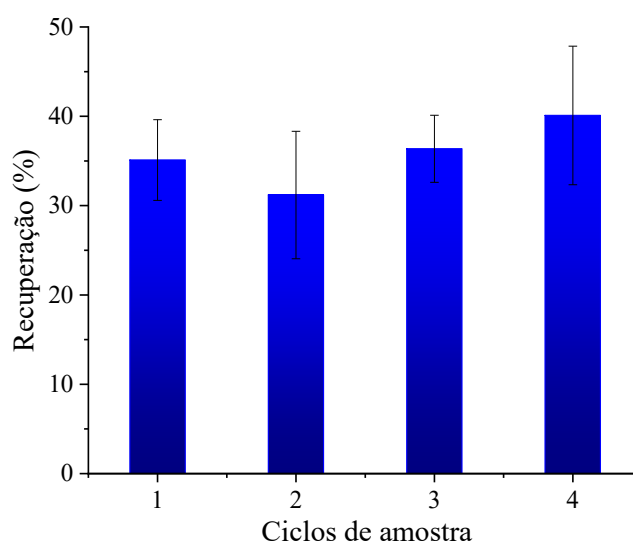
De acordo com os resultados apresentados na Figura 33, o solvente que apresentou a maior taxa de eluição da NDMA dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente foi a acetonitrila, apesar da % de recuperação ter sido inferior a 40 %. A acetonitrila é um solvente aprótico e se mostrou mais efetivo na interação com a NDMA que os solventes próticos, metanol e etanol. Além disso, a acetonitrila apresenta viscosidade ($0,34 \text{ cP}$)

menor que o etanol (1,08 cP) e o metanol (0,55 cP) (NIKAM; SHIRSAT; HASAN, 1998), que pode ter influenciado no processo de eluição da NDMA. Com a acetonitrila as taxas de recuperação apresentaram também uma melhor repetibilidade, sendo definida como eluente para o processo DPX.

4.3.4.2 Ciclos de aspiração da amostra

Como o processo DPX ocorre em fluxo, o tempo de contato entre os sítios do sorvente monolítico e a amostra é mínimo, assim, a passagem da mesma amostra repetidas vezes (ciclos de aspiração) pelo dispositivo de extração foi avaliado para melhoria da taxa de recuperação do NDMA. Diferentes ciclos de amostra foram estudados, utilizando a acetonitrila como eluente. Fixou-se o volume de acetonitrila em 500 μ L para um único ciclo, enquanto o volume da amostra permaneceu em 1,0 mL, porém, esse volume foi aspirada e dispensada pela ponteira com o poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente de 1 até 4 ciclos sequenciais, promovendo assim um maior contato da amostra contendo o NDMA e o sorvente monolítico. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e as porcentagens de recuperação estão apresentados na Figura 34.

Figura 34. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função dos ciclos de aspiração da amostra. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 μ L.



Fonte: Próprio autor.

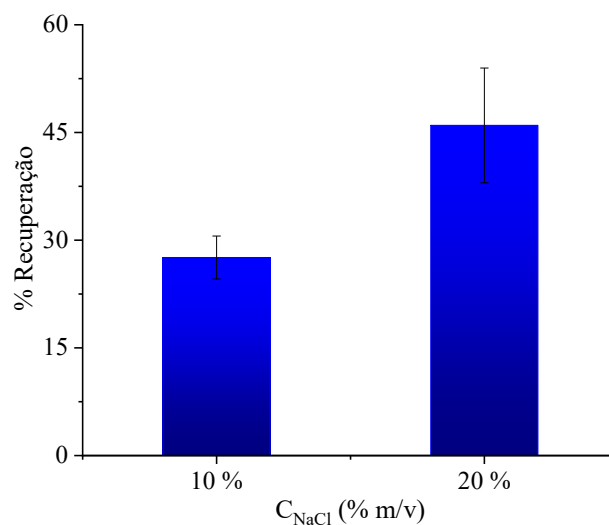
Com base nos dados obtidos para os diferentes ciclos de amostra aspirados pela fase monolítica na DPX, Figura 34, observa-se que não há uma diferença estatisticamente significativa na porcentagem de recuperação entre a utilização de um ou quatro ciclos, mantendo-se na faixa de 31 a 39 %. Assim, o uso de um ciclo de aspiração da amostra foi definido como a condição adequada para o método DPX proposto, evitando maior tempo de extração e maior propagação de erros com uso de mais ciclos.

4.3.4.3 Uso de aditivo na amostra líquida

Com o objetivo de aumentar a taxa de recuperação da NDMA, foi avaliado o aumento da força iônica da amostra pela adição de NaCl. Nesta condição, o aumento da taxa de recuperação da NDMA pode ocorrer devido ao efeito "salting out", no qual os íons resultantes da dissociação do sal na amostra atraem moléculas de água que dessolvatam a NDMA, facilitando a interação da NDMA para interação com os sítios seletivos do monolito impresso molecularmente. Foram avaliadas quatro concentrações de NaCl na amostra: 10, 20, 30 e 40 % (m/v).

As concentrações de 30 e 40 % (m/v) apresentaram saturação do sal na amostra, impedindo a aspiração da amostra por bloqueio dos poros do sorvente monolítico. Assim, avaliou-se apenas as concentrações de 10 e 20 % (m/v) de NaCl. As porcentagens de recuperação da NDMA das amostras, com força iônica aumentada, estão apresentadas na Figura 35.

Figura 35. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do aumento da força iônica da amostra. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 μ L.



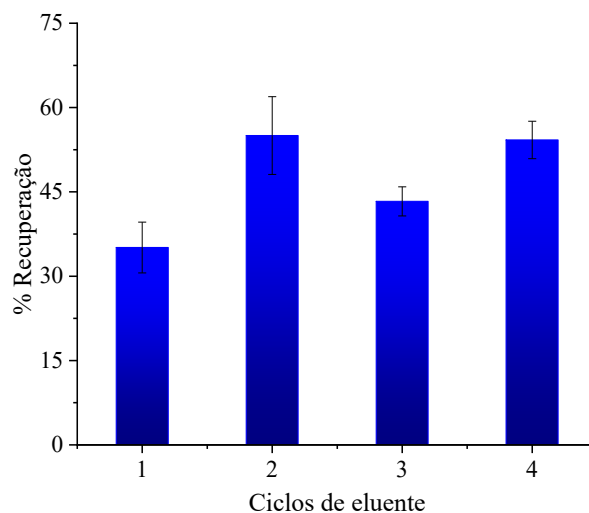
Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados da Figura 35, a adição de NaCl à amostra apresenta efeito duplo na taxa de recuperação da NDMA do processo DPX. Sob concentração de 10 % (m/v) de NaCl na amostra houve uma diminuição da taxa de recuperação da NDMA, enquanto para 20 % (m/v) houve um ganho na porcentagem de recuperação da NDMA, quando comparado com a amostra sem o aditivo. Esta pode ser provocada por uma combinação dos efeitos salting-in e salting-out, que se mostra dependente da concentração de NaCl na amostra (DEAK; MURPHY; JOHNSON, 2006). Como a adição de sal levou a um aumento relativamente pequeno da taxa de recuperação da NDMA, o processo de extração DPX em fluxo foi mantido sem adição de NaCl na amostra.

4.3.4.4 Ciclos de aspiração do eluente

Como não houve ganho significativo na recuperação da NDMA com o uso de NaCl na amostra aquosa, o maior problema na recuperação pode não estar na retenção da NDMA no sorvente monolítico, mas na sua eluição do poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente. Assim, foram avaliadas eluições com a mesma fração de acetonitrila, porém na forma de ciclos, ou seja, eluindo o mesmo volume de solvente mais de uma vez pelo monolito contendo a NDMA retida. Nesta etapa foram mantidas fixadas, as condições definidas anteriormente, como aspiração de 1,00 mL de amostra em um único ciclo, solvente de eluição a acetonitrila em um volume de 500 μ L. Foram avaliados até 4 ciclos consecutivos do volume de 500 μ L da acetonitrila. O resultados de recuperação da NDMA do processo DPX em fluxo estão apresentados na Figura 36.

Figura 36. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do número de ciclos de aspiração de eluente. Condições de extração: volume de amostra 1,0 mL; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 μ L.



Fonte: Próprio autor.

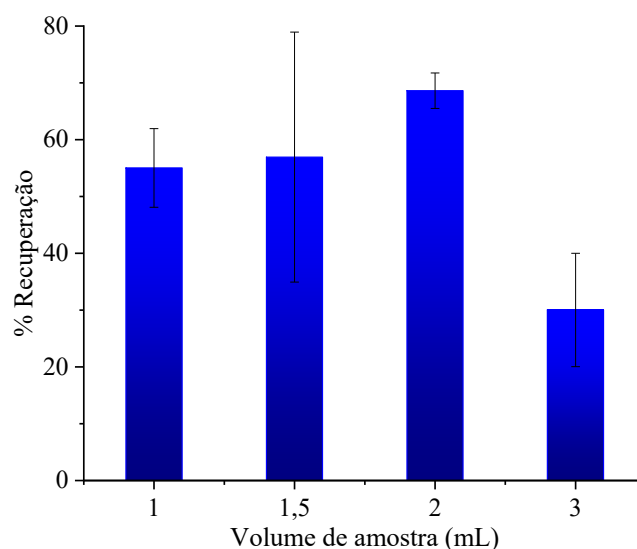
Os ciclos do eluente tiveram um efeito mais significativo na taxa de recuperação da NDMA, elevando para cerca de 55 % de extração a partir de dois ciclos de aspiração de acetonitrila em 500 μ L, Figura 36. Acima de dois ciclos a mudança não é estatisticamente significativa, portanto, foram fixados dois ciclos de aspiração de eluente nesta etapa. Os ciclos de aspiração funcionam como um aumento do volume de eluente passando pelo sorvente monolítico, sem efetivamente consumir maior quantidade de solvente. Em um processo de extração em fluxo, como o que ocorre no sorvente monolítico na ponteira, a taxa de transferência de massa deve ser muito alta e a afinidade do analito pelo sorvente ou pelo eluente deve ser elevada (coeficiente de partição elevado) para resultar elevadas taxas de recuperação do analito. Outra alternativa seria reduzir a vazão do eluente para compensar uma taxa de transferência de massa lenta do analito retido nos sítios do sorvente monolítico para o eluente. A vazão média de eluição da acetonitrila pelo monolito na ponteira foi de 1,3 mL/min. No entanto, essa vazão foi mantida fixa em todo o trabalho.

4.3.4.5 Volume de amostra

O efeito de concentração ou pré-concentração do processo DPX foi avaliado a partir do aumento do volume de amostra, mantendo fixo o volume de eluente. A pré-concentração de um analito durante o preparo de amostras é essencial para substâncias que se encontram em concentrações abaixo do limite de detecção/quantificação da técnica analítica instrumental (PARR;

JOSEPH, 2019; GÉHIM *et al.*, 2023). Como a NDMA ocorre em concentrações baixas nos APIs na ordem de nanogramas/tablet (WHITE, 2020), ou $> \text{ng mg}^{-1}$, é desejável que o método DPX em fluxo seja capaz de concentrar a NDMA no extrato e garantir sua quantificação com maior confiabilidade no sistema GC-MS. A capacidade do método DPX em fluxo, empregando o sorvente monolítico impresso molecularmente, de concentrar o NDMA no extrato foi avaliada testando os volumes de amostra de 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mL. As porcentagens de recuperação obtidas estão apresentadas na Figura 37.

Figura 37. Porcentagens de recuperação de NDMA após extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMTPA-co-MAA-co-EDMA) em função do volume de amostra. Condições de extração: um ciclo de amostra; eluente acetonitrila; volume de eluente 500 μL ; dois ciclos de eluição de acetonitrila.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Figura 37, observa-se que o volume de 2,0 mL de amostra resultou em uma maior porcentagem de recuperação da NDMA, levando em consideração a concentração em cada medida em função dos diferentes volumes de amostra. A taxa de recuperação alcançada foi de $68,7 \pm 3,1 \%$ para o NDMA, sendo considerada aceitável por se tratar de um processo em fluxo com tempo total de extração de ~ 3 min. Como a concentração final no extrato foi mantida fixa neste estudo, um maior volume de amostra inicial significou uma amostra com concentração de NDMA mais diluída. Essa condição pode ter favorecido uma melhor interação da NDMA com os sítios do sorvente monolítico, impedindo a competição entre moléculas de NDMA pelo mesmo sítio em amostras mais concentradas. No entanto, a partir de 3,0 mL de amostra é provável que tenha ocorrido a lixiviação das moléculas de NDMA já retidas no sorvente monolítico (efeito *breakthrough*), frente ao volume significativo de amostra para o sistema miniaturizado. Desta

forma, o volume de 2,0 mL de amostra foi fixada como condição de aplicação do método DPX em fluxo. Nesta condição o método DPX apresenta um fator de concentração de quatro vezes para a NDMA no extrato. Outro fator a ser observado na Figura 37 é a dispersão dos resultados em torno das médias de recuperação, com exceção para o volume de 1,5 mL de amostra de água que o RSD ficou em 22 %, os demais valores de RSD foram inferiores a 10 %. Este resultado pode ser considerado satisfatório por envolver diferentes lotes de preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impressos molecularmente.

Desta forma o método de extração DPX em fluxo de NDMA de amostras líquidas aquosas foi otimizado univariadamente, empregando o monolito poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente, com um ciclo de 2,0 mL de amostra e dois ciclos de 500 μ L de acetonitrila, empregando uma vazão de 1,3 mL min⁻¹ dos líquidos.

Considerando que a porcentagem de recuperação máxima alcançada pelo método DPX em fluxo foi de aproximadamente 70 %, uma medida adicional foi conduzida para avaliar se os 30 % restantes de NDMA permaneceram retidos no sorvente monolítico MIP ou na amostra. Para isso, foi realizada uma segunda extração utilizando a amostra previamente extraída e uma segunda ponteira com sorvente monolítico MIP sob às condições otimizadas. A segunda extração resultou em uma porcentagem de extração de 7 %. Provavelmente, os ~23 % de NDMA devem ter ficado retidos no primeiro sorvente monolítico MIP, corroborando com a ideia de que uma vazão mais lenta do eluente pelo sorvente monolítico pode resultar em melhores taxas de recuperação do analito por compatibilizar a eluição com a taxa de transferência de massa do analito para o eluente. Outra explicação possível é que poros menores dos sorvente monolítico contendo sítios de interação seletiva, podem ser obstruídos durante a passagem do solvente devido ao efeito de compressão do polímero orgânico em contato com o solvente, resultando no aprisionamento da molécula de NDMA na estrutura monolítica.

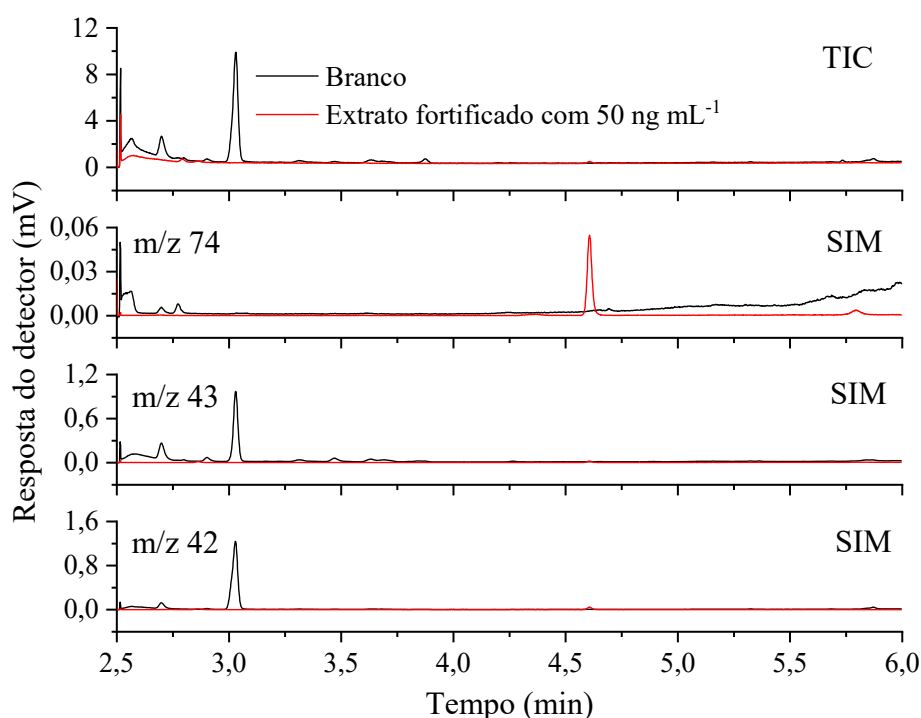
4.3.5 Validação do método DPX-GC-MS para determinação de NDMA

A validação do método de determinação de NDMA em amostras líquidas, empregando a extração DPX em fluxo com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) e a quantificação por GC-MS, foi realizada pela avaliação da seletividade, faixa de trabalho, linearidade, LoQ, exatidão e precisão, conforme recomendado pelo protocolo do ICH, documento Q2(R2) (ICH, 2023).

4.3.5.1 Seletividade

A seletividade do método DPX-GC-MS para determinação de NDMA de amostras líquidas foi avaliada pela comparação dos cromatogramas do extrato de uma amostra em branco (sem fortificação de NDMA) e de uma solução padrão de NDMA. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 38.

Figura 38. Cromatogramas nos modos TIC e SIM do extrato de uma amostra em branco e de solução de padrão de NDMA.



Fonte: Próprio autor.

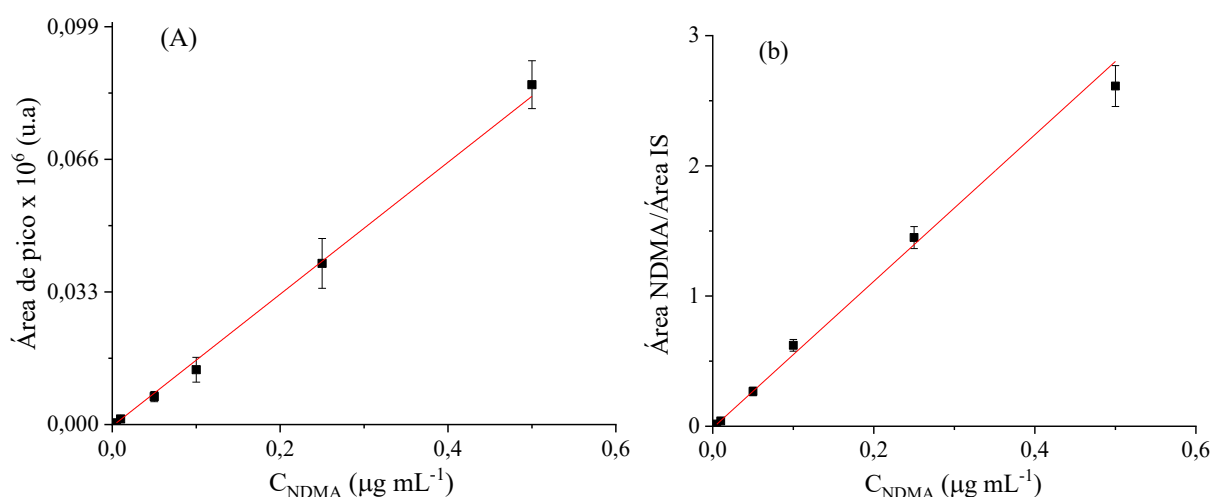
De acordo com os cromatogramas da Figura 38, é possível observar que não há interferência no tempo de retenção da NDMA ($t_R = 4,62$ minutos), em nenhuma das m/z avaliadas. Indicando que o método fornece boa seletividade para a determinação de NDMA após o processo de extração DPX com sorvente monolítico de amostras líquidas aquosas.

4.3.5.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho de um método analítico para determinação de fármacos e produtos medicinais de acordo com o protocolo ICH deve compreender 50 a 150 % da dosagem do princípio ativo. No entanto, a NDMA é considerada uma contaminação do API, assim a concentração deve

ser a menor possível na formulação farmacêutica. Assim, a faixa de trabalho do método DPX-GC-MS, que é a faixa de concentrações de NDMA que se espera encontrar em formulações farmacêuticas, foi definida entre a menor concentração quantificável pela técnica instrumental até 100 vezes esse valor, de 0,005 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA ou de $1\times$ até $100\times\text{LoQ}$ do instrumento. Essa faixa de trabalho, composta por seis concentrações distintas de soluções padrão de NDMA, constituiu a curva analítica para calibração da resposta da nitrosaminas. As áreas de pico da NDMA registradas nos cromatogramas de cada uma das soluções padrão analisadas foram plotadas em função das concentrações de NDMA e estão apresentadas na Figura 39A. Em cada solução padrão foi adicionado o isopentanol a 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ como IS e suas áreas foram registradas para construção de outra curva analítica pelo método do padrão interno, Figura 39B.

Figura 39. Curvas analíticas obtidas pelos métodos (A) do padrão externo e (B) do padrão interno para soluções de NDMA em acetonitrila.



Fonte: Próprio autor.

A curvas analíticas obtidas na faixa de 0,005 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA apresentaram boa relação linear tanto pelo método do padrão externo (Figura 39A) quanto do padrão interno (Figura 39B). A curva analítica obtida pelo método do padrão externo resultou em um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9973 e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9935, acima do critério de aceitação indicado pelo protocolo do ICH, $> 0,9900$ (ICH, 2023). A curva analítica construída pelo método do padrão interno apresentou linearidade, expressa pelos valores de r e R^2 de 0,9965 e 0,9914, respectivamente. Ambos as curvas analíticas, portanto, apresentaram linearidade adequada para a faixa de concentrações de NDMA.

Como a injeção na cromatografia gasosa no modo de razão de divisão de fluxo (*split*) apresenta uma baixa repetibilidade do volume de amostra injetado na coluna cromatográfica

(GROB, 2003), foi empregada a curva analítica obtida pelo método do padrão interno, por esta compensar os problemas de repetibilidade de injeção dos extratos obtidos neste trabalho. A equação da reta obtida para curva analítica pelo método do padrão interno está apresentada na Equação 7.

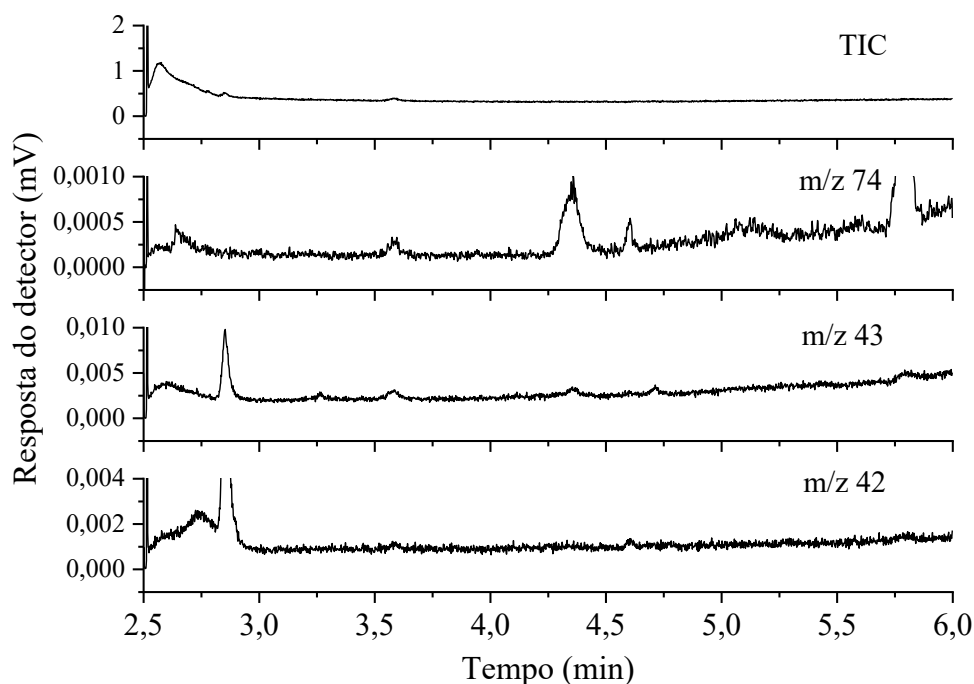
$$A_{NDMA}/A_{IS} = 5,629 * [NDMA]_{\mu g\ mL^{-1}} - 0,013 \quad \text{Equação 7}$$

Em que: A_{NDMA} : área do pico do NDMA; A_{IS} : área do pico do padrão interno (isopentanol).

4.3.5.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado através da análise de soluções padrão de NDMA diluídas sucessivamente até o desaparecimento do pico no cromatograma, sendo considerada a concentração anterior a menor concentração de NDMA capaz de ser quantificada pelo equipamento, desde que a área do pico apresente valores de $RSD < 20\%$ em 5 análises consecutivas. A concentração de NDMA definida por este método como o LoQ do instrumento foi de $0,005\ \mu g\ mL^{-1}$ e o cromatograma representativo desta solução está apresentado na Figura 40.

Figura 40. Cromatogramas da solução padrão de NDMA a $0,005\ \mu g\ mL^{-1}$ para a definição do LoQ do instrumento.



Fonte: Próprio autor.

Como visto nos cromatogramas da Figura 39 o pico no tempo de 4,62 min no modo SIM de razão m/z 74 é mais intenso, com menor efeito de ruído da linha de base que para outras razões m/z ou no cromatograma do modo TIC. A quantificação da NDMA foi realizada sempre no cromatograma SIM de razão m/z 74. As cinco injeções da solução de NDMA a $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultou em áreas de pico com valores de RSD de 17,73 %, inferior aos 20 % aceitáveis pelo guia de validação proposto pelo ICH (ICH, 2023).

Para determinar o LoQ do método proposto foi considerada a menor concentração de NDMA quantificável pelo GC-MS nas condições de análise (LoQ_{inst}), a taxa de recuperação de NDMA e o fator de concentração do método DPX em fluxo. O LoQ do método (LoQ_{met}) foi calculado a partir da Equação 8.

$$\text{LoQ}_{\text{met}} = \frac{\text{LoQ}_{\text{inst}} \times 100}{\text{FC} \times \%R_{\text{NDMA}}} \quad \text{Equação 8}$$

Em que: LoQ_{met} : menor concentração quantificada pelo método, LoQ_{inst} : menor concentração quantificada pelo GC-MS, $\%R_{\text{NDMA}}$: porcentagem de recuperação de NDMA pelo método; FC: fator de concentração.

De acordo com a Equação 8, o valor do LoQ_{met} foi de $0,0018 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a NDMA na amostra aquosa, ou $1,82 \text{ ng mL}^{-1}$, levando em consideração a taxa de recuperação do NDMA e o fator de concentração do método DPX em fluxo. Estes valores estão compatíveis com a necessidade de determinação de NDMA em formulações farmacêuticas ou em fluidos biológicos, como urina e saliva que é da ordem de ng/tablet ou ng mL^{-1} e comparáveis com os métodos mais sensíveis relatados na literatura (PARR; JOSEPH, 2019; FRITZSCHE *et al.*, 2022; GIMÉNEZ-CAMPILLO *et al.*, 2023). Além disso, o método se torna útil para determinar NDMA em formulações farmacêuticas para avaliação dose diária consumida de NDMA pelas pessoas, uma vez que o limite aceitável é de 96 ng/dia , segundo o guia sobre controle de nitrosaminas em insumos farmacêuticos aprovado pela Agência de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA, 2022).

4.3.5.4 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método DPX-GC-MS foram avaliadas a partir da recuperação de NDMA de amostras aquosas fortificadas com os padrões de NDMA nas concentrações $5 \times \text{LoQ}_{\text{INST}}$, $10 \times \text{LoQ}_{\text{INST}}$ e $15 \times \text{LoQ}_{\text{INST}}$, realizadas em triplicata e em três dias distintos. As taxas de recuperação de NDMA das amostras fortificadas empregando o método DPX em fluxo estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Taxas de recuperação de NDMA de amostras aquosas em três níveis de fortificação e em três dias distintos, empregando o método DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

C _{NDMA} (ng mL ⁻¹)		Intra-dias (n = 3)			Inter-dias (n = 6)		
		Recuperação (%)		RSD (%)	Recuperação (%)		RSD (%)
5×LoQ _{INST}	25,00	64,17	62,53	1,87	69,30	62,34	4,27
		60,49			61,26		
		62,93			56,47		
10×LoQ _{INST}	50,00	66,24	60,57	4,92	61,71	61,34	3,22
		58,08			60,10		
		57,40			62,22		
15×LoQ _{INST}	75,00	57,80	63,47	6,29	61,40	56,10	8,26
		70,24			61,77		
		62,36			45,12		

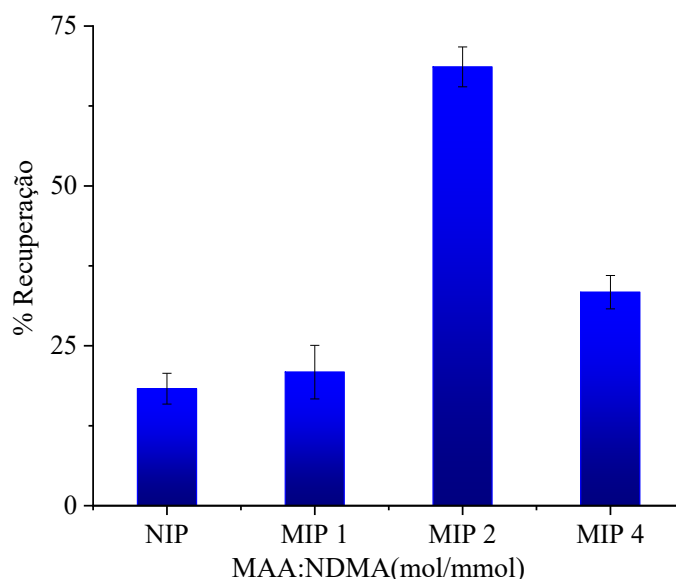
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 21, é observado que as taxas de recuperação de NDMA, para os diferentes níveis de fortificação e em diferentes dias de realização das extrações pelo método DPX em fluxo, ficou na faixa de 56,10 a 63,47 %. Este resultado está fora da faixa de 70-130 % estabelecida como critério de aceitação para um método ser considerado exato pelo documento Q(2)R(2) do ICH (ICH, 2023). Como já discutido anteriormente, o processo de extração em fluxo e de forma tão rápida como a passagem da amostra e do eluente pela estrutura monolítica pode ter sido preponderante para essa condição. No entanto, observa-se que há uma consistência na taxa de recuperação de NDMA das amostras aquosas, obtendo valores de RSD intra- e inter-dias entre 1,87 e 8,26 %. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios, não somente por estar dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo ICH para um método preciso, de RSD < 20 %, mas por se tratar do uso de diferentes sorventes monolíticos MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) sob diferentes lotes de preparação. Somente neste estudo foram empregados 27 ponteiros com sorventes monolíticos MIP produzidos neste trabalho. Além disso, não há mudança significativa nas extrações quando o processo é realizado em momentos distintos, uma vez que a precisão intermediária do método resultou em valores de RSD entre 3,22 e 8,26 % para as recuperações de NDMA de amostras aquosas.

4.3.6 Avaliação do fator de impressão da NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA)

O fator de impressão (IF) da molécula de NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) foi calculado pela razão entre as porcentagens de recuperação do MIP e NIP do sorvente

monolítico. O IF é um parâmetro para avaliar a eficiência do processo de impressão molecular. Quando $IF \leq 1$, indica que não houve a impressão de sítios específicos, complementares ao analito, no sorvente; se $IF > 1$ indica que houve a impressão de sítios de interações provenientes da molécula-template na estrutura polimérica (NDUNDA, 2020), portanto, é desejado um valor de IF maior que 1. Para a determinação do IF, os sorventes monolíticos MIP e NIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) foram submetidos a extração de amostras aquosas fortificadas com NDMA, empregando o processo DPX em fluxo. Três diferentes preparações do MIP foram avaliadas nas razões molares NDMA:MAA (mmol:mol) de 2,56:1,00, 1,28:1,00 e 0,64:1,00. As porcentagens de recuperação de NDMA obtidas com o NIP e MIPs estão apresentadas na Figura 41.

Figura 41. Recuperação de NDMA, empregando processo DPX em fluxo (n=3) com sorventes NIP e MIPs na condições otimizadas e validadas.



Fonte: Próprio autor.

Com base nos resultados apresentados na Figura 41, é possível inferir que o MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) na razão molar NDMA:MAA 1,28:1,00 alcançou uma porcentagem de recuperação mais elevada, atingindo 69,82 % entre os monolitos avaliados. Quando comparado ao NIP que apresentou recuperação de apenas 18,69 % de NDMA, todos os monolitos MIPs apresentaram maiores taxas de recuperação, indicando a ocorrência da impressão de sítios complementares da molécula de NDMA.

Ao comparar as três modificações MIP propostas neste trabalho, pode-se inferir que a proporção 1,28:1,00 de *template*:monômero resultou em uma impressão molecular mais eficiente de sítios da NDMA na estrutura monolítica. Concentrações maiores da molécula-modelo levaram a uma diminuição da taxa de impressão e esse resultado é um indicativo de que o aumento da razão

molar NDMA:MAA leva à formação de uma quantidade de sítios ativos que podem afetar a estrutura polimérica de forma a torná-la menos rígida, se tornando mais suscetível a processos de inchaço e compressão ocluindo as cavidades de reconhecimento molecular (RAMPEY *et al.*, 2004; NDUNDA, 2020). Desta forma, o MIP com razão molar NDMA:MAA (1,28 mmol:1,00mol) foi escolhido para uso no processo de extração DPX em fluxo. O fator de impressão para o NDMA no poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) na razão molar NDMA:MAA 1,28:1,00, empregando a Equação 6, foi de $IF = 3,75$, podendo ser considerado um elevado fator de impressão.

4.4 Conclusões parciais

Com base nos resultados obtidos neste capítulo, pode-se concluir que foi possível incorporar o monômero de ácido metacrílico (MAA) à estrutura do poli(TMPTA-co-EDMA), preparado sob condições otimizadas no Capítulo 3, sem causar mudanças significativas na morfologia. A inclusão do MAA possibilitou a impressão da molécula de NDMA na estrutura polimérica, devido a formação do complexo MAA-NDMA durante a mistura reacional, deixando sítios ativos complementares ao NDMA no monolito após o processo de polimerização *in situ* e resultando em um fator de impressão de 3,75. Assim, o sorvente monolítico MIP produzido foi empregado no processo DPX em fluxo para extração de NDMA de amostras aquosas.

O método DPX para extração em fluxo de NDMA de amostras aquosas foi otimizado quanto ao tipo de eluente, ciclos de amostra, uso de aditivos na amostra, ciclos de eluente e volume de amostra. O método otimizado consistiu na aspiração de 2,0 mL de amostra em um único ciclo, seguido pela eluição com 2 ciclos de 500 μL de acetonitrila. O método foi validado conforme as diretrizes do Guia de validação de Procedimentos Analíticos proposto pelo ICH Q2(R2). Apesar da exatidão do método ficar abaixo do critério de aceitação do ICH para métodos serem considerados de boa exatidão, a boa precisão das medidas; a boa detectabilidade, com limite de quantificação de $1,82 \text{ ng mL}^{-1}$ e a reprodutibilidade lote-a-lote de preparação dos monolitos de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impressos molecularmente indicaram que o método DPX apresenta potencial para a extração de NDMA de amostras líquidas.

CAPÍTULO 5

APLICAÇÃO DO SORVENTE

**MONOLÍTICO MIP DE POLI(TMPTA-
CO-EDMA-CO-MAA) NA EXTRAÇÃO**

DE NDMA DE FORMULAÇÕES

FARMACÊUTICAS

5.1 Introdução

Em 2018, agências reguladoras de todo o mundo emitiram alerta sobre a possível presença de nitrosaminas acima dos níveis permitidos em medicamentos, especialmente os identificados como “sartanas”, que são antagonistas dos receptores de angiotensina II, utilizados para controle da pressão arterial. Em 2019, foi reportada a presença de nitrosaminas em outras classes de medicamentos, como nizatidina, ranitidina e metformina. Em 2022, a ANVISA suspendeu a importação de API e a comercialização de medicamentos a base de ranitidina no Brasil por gerar nitrosaminas, em particular a NDMA, acima dos níveis aceitáveis a partir da degradação do API, o que poderia aumentar o risco de desenvolvimento de cânceres a quem consumisse o medicamento (ANVISA, 2022). Desta forma, foram estabelecidas diretrizes sobre a contaminação por N-nitrosaminas para todos os medicamentos no mercado, incluindo o recolhimento de diversos lotes com limites acima dos aceitáveis.

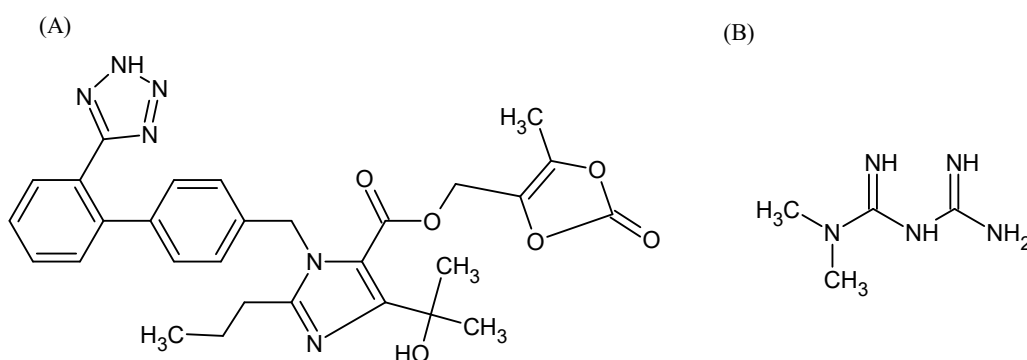
Embora não se espere que as nitrosaminas estejam presentes atualmente nos APIs e ou nos medicamentos comercializados, é imperativo que se monitore a possível presença de NDMA nos medicamentos com potencial de geração deste contaminante. Para este monitoramento tem sido propostos diversos métodos analíticos baseados em preparos de amostras mais simples, eficientes e ambientalmente corretos. Neste Capítulo é demonstrada a aplicação do método DPX para extração em fluxo de NDMA de algumas formulações farmacêuticas com potencial de geração da N-nitrosamina, empregando o sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

5.2 Metodologia

5.2.1 Processamento dos medicamentos

Foram adquiridas amostras comerciais em farmácias na cidade de Ituiutaba-MG de comprimidos de API com potencial de geração de NDMA, sendo elas a Olmesartana Medoxomila 20 mg Eurofarma®, Cloridrato de Metformina 500 mg e Cloridrato de Metformina 850 mg fabricado pela Prati-Donaduzzi®. As estruturas químicas dos fármacos são apresentadas na Figura 42. Duas unidade de drágeas foram maceradas com pistilo em grau de vidro até obtenção de um pó finamente dividido e homogêneo. com auxílio de banho ultrassom, em 50,00 mL de água. O material sólido residual foi removido por filtração em filtros de seringa Chromafil® Xtra PTFE com 25 mm de diâmetro e tamanho de poros de 0,45 μm . O filtrado, solução aquosa do fármaco, foi submetido ao método DPX proposto neste trabalho.

Figura 42. Estruturas químicas dos princípios ativos das formulações farmacêuticas submetidas ao método DPX proposto. (A) Olmesartana e (B) metformina.



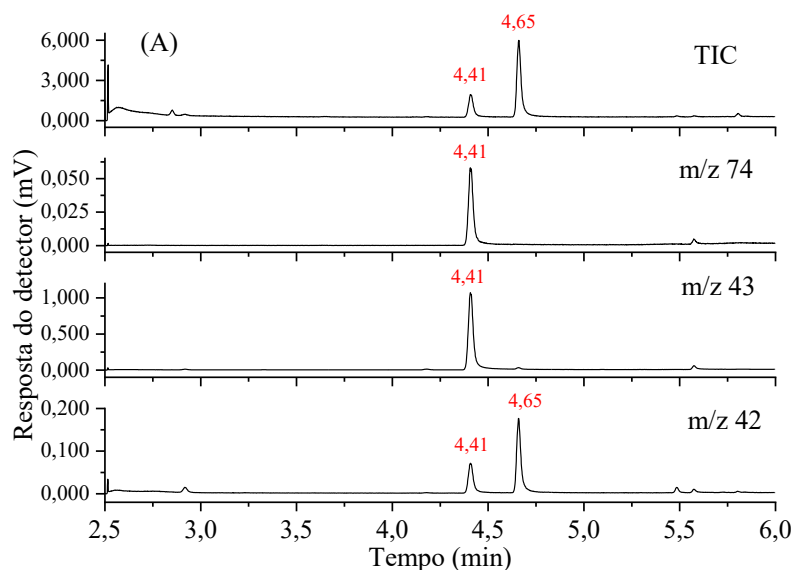
1,3 mL min⁻¹. Em seguida, 500 µL de acetonitrila foi aspirada, pela mesma ponteira, e dispensada novamente no frasco de vidro, sendo repetido esse processo por duas vezes (dois ciclos) a uma vazão de 1,3 mL min⁻¹. O extrato orgânico, recolhido após o segundo ciclo, foi analisado por GC-MS nas condições indicadas na seção 4.2.5.

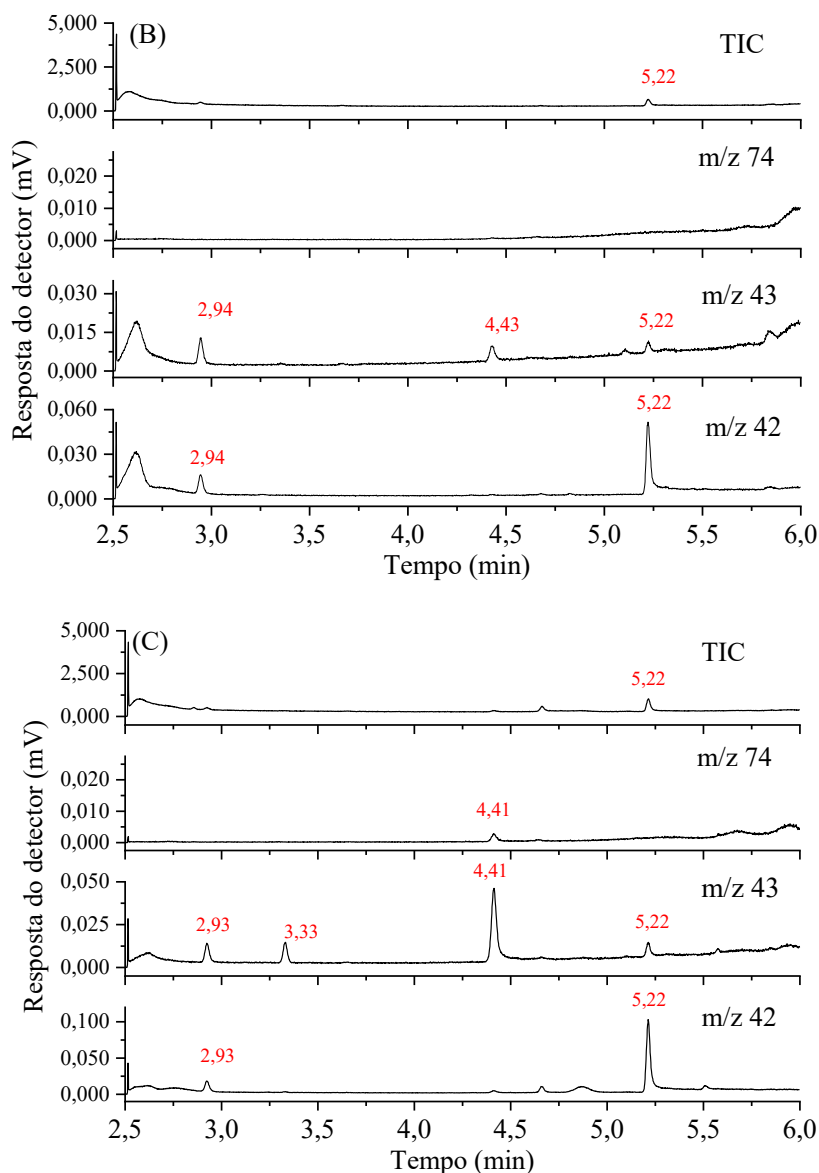
5.3 Resultados e discussão

O método DPX com o sorvente monolítico MIP aplicado às amostras de formulação farmacêutica resultou em processo de extração simples, de poucas etapas, rápido e totalmente portátil, podendo ser aplicado em qualquer local sem a necessidade de infraestrutura laboratorial. Por se tratar de um método miniaturizado na ponta da ponteira da micropipeta, o método requer o uso de pequenos volumes de solventes orgânicos, sendo também ambientalmente amigável.

As amostras analisadas apresentaram concentrações distintas de seus princípios ativos nas soluções farmacêuticas, se tornando um desafio adicional para a extração da NDMA devido a possibilidade de saturação de sítios do sorvente monolítico, já que parte da estrutura desses princípios ativos é similar à estrutura do NDMA. Os cromatogramas dos extratos de amostras não fortificadas das soluções farmacêuticas são apresentados na Figura 43.

Figura 43. Cromatogramas dos extratos das soluções farmacêuticas submetidas ao processo de extração DPX com sorvente monolítico MIP. (A) Olmesartana medoxomila 20 mg, (B) cloridrato de metformina 500 mg e (C) cloridrato de metformina 800 mg.



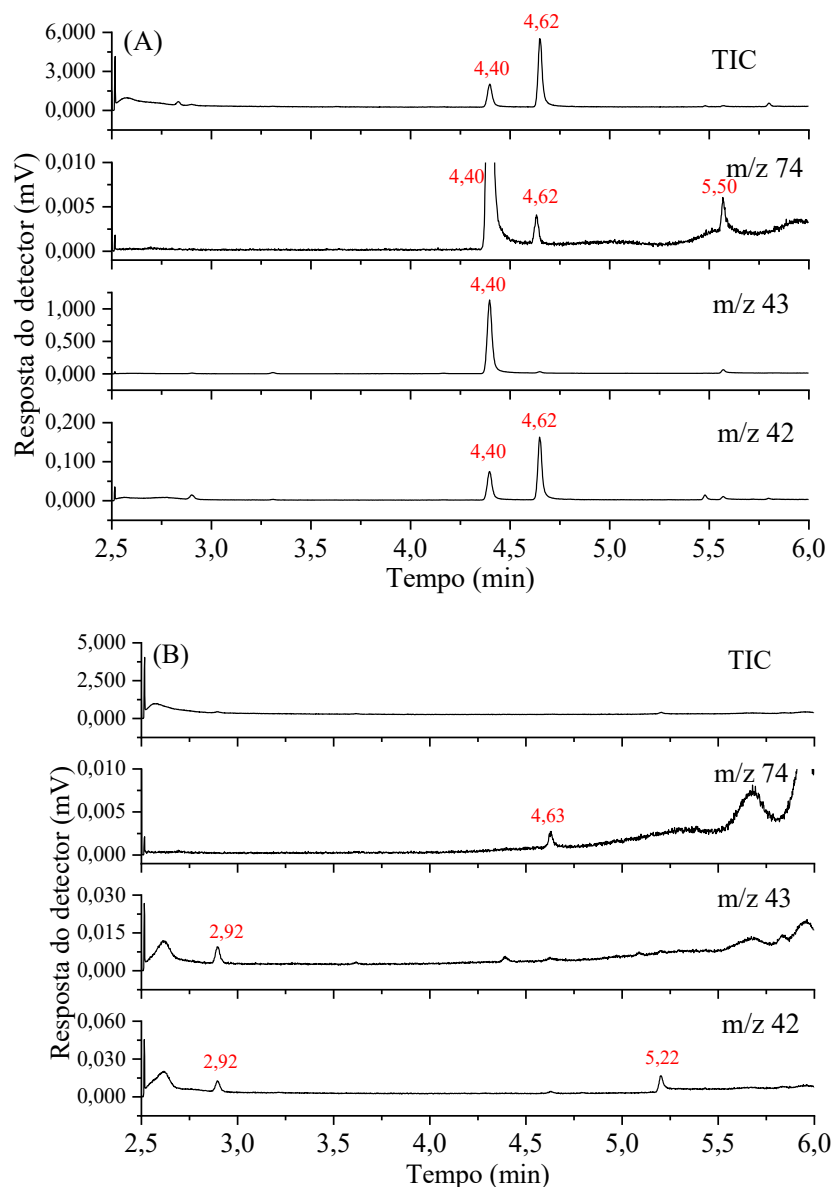


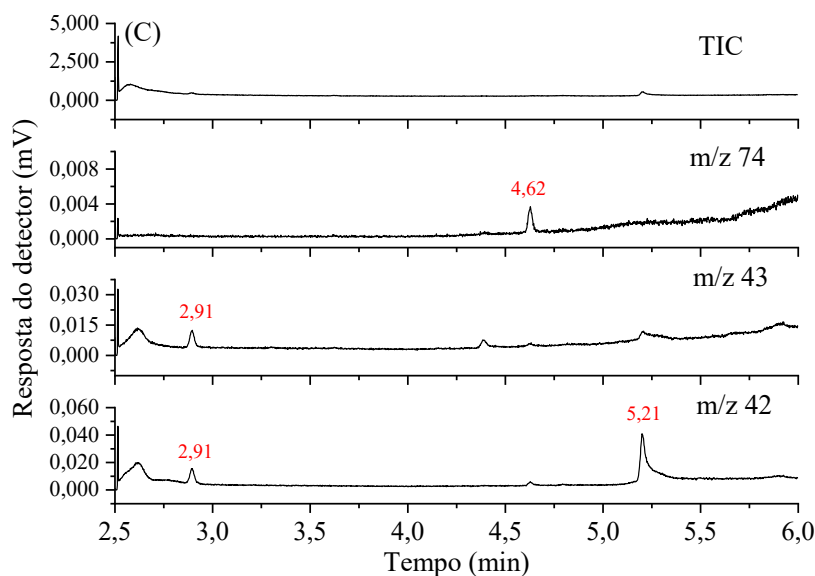
Fonte: Próprio autor.

Ao analisar os cromatogramas da Figura 43, observa-se diferença nos perfis de separação para as diferentes formulações farmacêuticas e o registro de picos nos cromatogramas SIM mesmo sem a fortificação do NDMA. Contudo, em nenhuma das amostras foi identificado o pico correspondente ao NDMA. Na amostra de olmesartana 20 mg, um pico foi observado no mesmo tempo de retenção do NDMA no modo SIM de razão m/z 42. No entanto, esse pico não foi confirmado na biblioteca do equipamento como sendo o NDMA e nem mesmo resultou em sinais nas demais razão m/z monitoradas. Como a análise cromatográfica do NDMA está sendo realizada no modo SIM com razão m/z 74, esse composto não será interferente na medida do NDMA. Nas amostras de metformina, foram identificados alguns picos nos cromatogramas do modo SIM, mas com tempos de retenção e espectros de massas distintos do NDMA.

A aplicabilidade do método DPX em fluxo para a extração de NDMA das soluções farmacêuticas foi avaliada pela fortificação das amostras com uma solução padrão de NDMA a 50 ng mL⁻¹ e submetidas à extração nas condições otimizadas. Os cromatogramas obtidos para as amostras fortificadas estão apresentados na Figura 44.

Figura 44. Cromatogramas dos extratos das amostras de soluções farmacêuticas fortificadas com 50 ng mL⁻¹ de NDMA obtidos no processo DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA). (A) olmesartana medoxomila 20 mg, (B) cloridrato de metformina 500 mg e (C) cloridrato de metformina 850 mg.





Fonte: Próprio autor.

Como observado nos cromatogramas da Figura 44 no modo SIM com razão m/z de 74, para todas as amostras farmacêuticas fortificadas com NDMA resultaram em extração do NDMA, pico registrado em 4,62 ou 4,63 min. Considerando a concentração de 50 ng mL^{-1} de NDMA adicionada às soluções farmacêuticas a taxa de recuperação pelo método DPX com o sorvente monolítico MIP foi calculada e os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 22. Recuperação de NDMA de diferentes formulações farmacêuticas, empregando o método DPX com sorvente monolítico MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA).

Amostras	C_{NDMA} adicionada (ng mL^{-1})	C_{NDMA} encontrada (ng mL^{-1})	Recuperação (%)	RSD (%)
Olmesartana medoxomila 20 mg	0,0	0,0		
	50,0	23,9	47,8	3,4
Cloridrato de metiformina 500 mg	0,0	0,0		
	50,0	35,1	70,1	4,6
Cloridrato de metiformina 850 mg	0,0	0,0		
	50,0	29,9	59,8	3,8

As porcentagens de recuperação obtidas para o NDMA nas amostras fortificadas estão compatíveis com o alcançado no método DPX otimizado, como pode ser observado na Tabela 21. Para a olmesartana medoxomila 20 mg a taxa de recuperação foi inferior a 50 %, provavelmente devido à interação de outros componentes dessa formulação com as cavidades de reconhecimento molecular do sorvente monolítico, uma vez que o extrato do branco desse medicamento já registrava um pico significativo no mesmo tempo de retenção da NDMA. Ou seja, apesar do pico

não ter sido identificado no espectrômetro de massas como sendo a NDMA, a estrutura molecular desse composto deve ser similar à NDMA e interagir de forma competitiva com o MIP. Por se tratar de um processo de extração em fluxo realizado de forma muito rápida na eluição (cerca de 45 segundos) e, como discutido anteriormente, a taxa de transferência de massa lenta do NDMA do sorvente para o eluente pode ser um fator preponderante para se obter extração mais eficiente no processo DPX proposto. De toda forma, a alta repetibilidade das medidas qualifica o método como uma alternativa simples, rápida e totalmente portátil para aplicação na extração de NDMA de formulações farmacêuticas.

CONCLUSÕES GERAIS

Após vários testes em busca da melhor condição de preparo de um sorvente monolítico seletivo à NDMA para ser aplicado na ponteira de micropipeta, que apresentassem características de rigidez, porosidade e permeabilidade de fluidos, foi possível obter um sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente com as características desejadas para a aplicação na extração em fluxo por DPX. O sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA) inicialmente preparado foi obtido na proporção de mistura monomérica:mistura porogênica de 20:80 % (m/m), em que a mistura monomérica consistiu em 30 % de TMPTA e 70 % de EDMA, enquanto a mistura porogênica de 30 % de solução metanólica de PEG a 10 % (m/v) e 70 % de isopropanol. Este monolito apresentou boa permeabilidade de líquidos, estabilidade térmica e elevada macroporosidade. Posteriormente, foi avaliada a inclusão de um monômero funcional na mistura monomérica, o MAA, para copolimerização com o TMPTA e o EDMA, deixando na estrutura monolítica sítios de interações hidrofílicas, nas mesmas condições otimizadas de preparação do poli(TMPTA-co-EDMA). O monolito de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) também apresentou alta porosidade, boa permeabilidade de líquidos com características morfológicas similares ao monolito sem MAA, contendo núcleos globulares sólidos e alta interconectividade de macroporos.

Através da caracterização estrutural e morfológica foi possível confirmar a estrutura polimérica formada, em que os sorventes obtidos apresentaram estrutura hierarquicamente porosa, confirmada por adsorção de gás N₂, micrografias eletrônicas de varredura e teste de macroporosidade. Essa característica foi imprescindível para uso do sorvente monolítico no processo de extração em fluxo por DPX.

A impressão da molécula de NDMA no sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) foi realizada em três proporções distintas 1, 2 e 4:1 mmol:mmol (NDMA:MAA). Os monolitos impressos molecularmente apresentaram maior capacidade de extração da NDMA que o monolito não impresso, garantindo um fator de impressão de 3,75 para a razão molar NDMA:MAA otimizada.

O sorvente monolítico de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) impresso molecularmente otimizado foi aplicado na extração em fluxo por DPX, sendo otimizados fatores do processo de extração como o tipo de eluente (acetonitrila), ciclos (1) e volume de amostra (2 mL), uso de aditivos na amostra (sem aditivos) e ciclos (2) e volumes (0,5 mL) de eluente. A taxa de recuperação da NDMA pelo processo DPX de extração em fluxo foi inferior a 70 %, que pode estar associada à taxa de transferência de massa lenta do analito do sorvente monolítico para o

eluente. O método DPX com sorvente monolítico MIP e análise de extratos por GC-MS foi validado, seguindo o protocolo proposto pelo ICH para contaminantes em formulações farmacêuticas. Após a validação, o método DPX em fluxo foi aplicado na determinação de NDMA de amostras farmacêuticas comerciais. A NDMA não foi detectada nas amostras, porém foram recuperados até 70 % de NDMA das amostras comerciais fortificadas com 50 ng mL⁻¹.

Desta forma, os sorventes monolíticos MIP de poli(TMPTA-co-EDMA-co-MAA) retidos na ponta da ponteira de 1000 µL se apresentam como potenciais materiais a serem aplicados em extração em fluxo por DPX, se tornando um método miniaturizado, simples, de fácil aplicação em qualquer ambiente, independente de infraestrutura laboratorial, e demandando de microvolumes de solventes orgânicos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H.R. Isolation, identification, biochemical properties and potential application of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain NEB-1. *Iranian Journal of Science and Technology*, v. 38, p. 221-229, **2014**.
- AGLIO, T.D.C.; DINIZ, V.; MATOS, M.F.A.V.; ROSA, P.P.C.; RATH, S. N-nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga. *Química Nova*, v. 45, p. 959-976, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170894>
- AHMAD, O.S.; BEDWELL, T.S.; ESEN, C.; GARCIA-CRUZ, A.; PILETSKY, S.A. Molecularly imprinted polymers in electrochemical and optical sensors. *Trends in biotechnology*, v. 37, p. 294-309, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>
- ALHARTHI, S.; EL RASSI, Z. Various strategies in post-polymerization functionalization of organic polymer-based monoliths used in liquid phase separation techniques. *Molecules*, v. 25, p. 1323, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25061323>
- ALIPOUR, S.; AZAR, P.A.; HUSAIN, S.W.; RAJABI, H.R. Synthesis, characterization and application of spherical and uniform molecularly imprinted polymeric nanobeads as efficient sorbent for selective extraction of rosmarinic acid from plant matrix. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 12, p. 2298-2306, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.04.021>
- ALOTHMAN, Z.A. A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials*, v. 5, p. 2874-2902, **2012**. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma5122874>
- ALSOLAIS, A.M.; ALTHAFAR, Z.M.; HASAN, M.R.; HAKAMI, M.A.; OMAR, B.I.A.; HESSIEN, K.B.G.; ALKHORAYEF, N.; KHAN, F.R. Ranitidine contaminated with N-nitrosodimethylamine (NDMA) link to carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, v. 14, p. 2031-2043, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.02.251>
- ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária. Guia sobre o controle de nitrosaminas em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos. Guia nº 50/2021 - versão 2, p. 1-28, **2022**.
- ATAWODI, S.E. Occurrence of preformed volatile nitrosamines in preparations of some Nigerian medicinal plants: a preliminary report. *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, p. 551-554, **2003**. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00304-6)
- ATAWODI, S.E.; LAMORDE, A.G.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Nitrosation of Nigerian medicinal plant preparations under ‘chemical’ and ‘simulated’ gastric conditions. *Food and chemical toxicology*, v. 33, p. 43-48, **1995**. DOI: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)80247-9](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)80247-9)
- AZIZI, A.; BOTTARO, C.S. A critical review of molecularly imprinted polymers for the analysis of organic pollutants in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1614, 460603, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460603>

BAI, X.; LIU, H.; WEI, D.; YANG, G. Preparation of a novel porous poly (trimethylol propane triacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic column for highly efficient HPLC separations of small molecules. *Talanta*, v. 119, p. 479-484, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.050>

BATISTA, A.D.; SILVA, W.R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted materials for biomedical sensing. *Medical Devices & Sensors*, v. 4, e10166, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1002/mds3.10166>

BELBRUNO, J. J. Molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews*, v. 119, p. 94-119, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>

BORDIN, D.C.M.; ALVES, M.N.R.; CAMPOS, E.G.; MARTINS, B.S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. *Journal of Separation Science*, v. 39, p. 1168-1172, **2016**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201500932>

BREWER, W.E. U.S. Patent n°. 6.566.145. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. **2003**.

BURATO, J.S.S.; MEDINA, D.A.V.; TOFFOLI, A.L.; MACIEL, E.V.S.; LANÇAS, F.M. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *Journal of Separation Science*, v. 43, p. 202-225, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>

CABRAL, J.L.; BANDILLA, D.; SKINNER, C.D. Pore size characterization of monolith for electrochromatography via atomic force microscopy studies in air and liquid phase. *Journal of Chromatography A*, v. 1108, p. 83-89, **2006**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.037>

CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R.D. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. *Analytica Chimica Acta*, v. 1192, 339383, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339383>

CARASEK, E.; SCUR, R.; BERNARDI, G. High-throughput analytical methods employing microextraction techniques: Towards fast analyses lasting a few seconds. *Advances in Sample Preparation*, v. 8, 100095, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100095>

CASTEGNARO, M.; PIGNATELLI, B.; WALKER, E.A. Analysis of volatile N-nitrosamines in commercial drugs. *Food and Cosmetics Toxicology*, v. 19, p. 489-491, **1981**. DOI: [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90455-7](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90455-7)

CASTILHO, L.M.B. Desenvolvimento, caracterização e aplicação de um sorvente monolítico polimérico para preparação rápida e portátil de amostras. 2023. 76 f. Dissertação (Mestrado Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, **2023**. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.255>

CHAVES, A.R.; MOURA, B.H.F.; CARIS, J.A.; RABELO, QUEIROZ, M.E.C. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1399, p. 1-7, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.027>

CHEMBASE, disponível em: <http://en.chembase.cn/molecule-102899.html>, acessada em fevereiro, **2024**.

CHEN, L.; XU, S.; LI, J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, v. 40, p. 2922-2942, **2011**. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0CS00084A>

CHO, M.G.; HYEONG, S.; PARK, K.K.; CHOUGH, S.H. Characterization of hydrogel type molecularly imprinted polymer for creatinine prepared by precipitation polymerization. *Polymer*, v. 237, 124348, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124348>

CORAZZA, G.; MERIB, J.; MAGOSSO, H.A.; BITTENCOURT, O.R.; CARASEK, E. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1513, p. 42-50, **2017**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.050>

CORMACK, P. A.; ELORZA, A.Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of chromatography B*, v. 804, p. 173-182, **2004**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>

COURTOIS, J.; BYSTRÖM, E.; IRGUM, K. Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation. *Polymer*, v. 47, p. 2603-2611, **2006**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.01.096>

CUI, Y.; JIANG, L.; LI, H.; MENG, D.; CHEN, Y.; DING, L.; XU, Y. Molecularly imprinted electrospun nanofibre membrane assisted stir bar sorptive extraction for trace analysis of sulfonamides from animal feeds. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 96, p. 382-389, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.01.045>

CURRIVAN, S.; JANDERA, P. Post-polymerization modifications of polymeric monolithic columns: a review. *Chromatography*, v. 1, p. 24-53, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.3390/chromatography1010024>

DAWSON, B.A.; LAWRENCE, R.C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 70, p. 554-556, **1987**. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/70.3.554>

DEAK, N.A.; MURPHY, P.A.; JOHNSON, L. Effects of NaCl concentration on salting-in and dilution during salting-out on soy protein fractionation. *Journal of Food Science*, v. 71, p. C247-C254, **2006**. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00028.x>

DIAS FILHO, N.L.; CARMO, D.R. Adsorption on Silica, Alumina and Related Surfaces. In: Hubbard, A. T. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. Marcel Dekker, New York, N. J., p. 1-20, 2004.

DING, L.; ZHANG, C.; WU, T.; YANG, F.; CAO, Y.; XIANG, M. The compression behavior, microstructure evolution and properties variation of three kinds of commercial battery separators under compression load. *Journal of Power Sources*, v. 451, p. 227819, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.227819>

DU, T.; CHENG, J.; WU, M.; WANG, X.; ZHOU, H.; CHENG, M. An *in situ* immobilized pipette tip solid phase microextraction method based on molecularly imprinted polymer monolith for the selective determination of difenoconazole in tap water and grape juice. *Journal of Chromatography B*, v. 951, p. 104-109, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.030>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel); SCHRENK, D.; BIGNAMI, M.; BODIN, L.; CHIPMAN, J.K.; DEL MAZO, J.; HOGSTRAND, C.; HOOGENBOOM, L.; LEBLANC, J.C.; NEBBIA, C.S.; NIELSEN, E.; NTZANI, E.; PETERSEN, A.; SAND, S.; SCHWERDTLE, T.; VLEMINCKX, C.; WALLACE, H.; ROMUALDO, B.; FORTES, C.; HECHT, S.; IAMMARINO, M.; MOSBACH-SCHULZ, O.; RIOLO, F.; CHRISTODOULIDOU, A.; GRASL-KRAUPP, B. Risk assessment of N-nitrosamines in food. *EFSA Journal*, v. 21, e07884, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7884>

EMA – European Medicines Agency. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emeah-a53-1490-assessment-report_en.pdf, acessada em janeiro, **2024**.

ENDER, F.; HAVRE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, N.; MADSEN, R.; CEH, L. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften*, v. 51, p. 637-638, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00623677>

FARIA, A.M.; BOTTOLI, C.B.G.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionária monolíticas para separações cromatográficas. *Química Nova*, v. 29, p. 300-309, **2006**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200022>

FENG, J.; FENG, J.; JI, X.; LI, C.; HAN, S.; SUN, H.; SUN, M. Recent advances of covalent organic frameworks for solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 137, 116208, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116208>

FERNANDES, A.R.; SOUZA, P.S.D.; OLIVEIRA, A.E.D.; CHAVES, A.R. A new method for the determination of creatinine in urine samples based on disposable pipette extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, p. 695-700, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170187>

FERREIRA, J.B.; MACRINO, C.J.; DINALI, L.A.F.; SILVA, C.F.; BORGES, K.B.; ROMÃO, W. Molecularly imprinted polymers as a selective sorbent for forensic applications in biological samples- a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 413, p. 6013-6036, **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03596-x>

FIGUEIREDO, E.C.; DIAS, A.C.B.; ARRUDA, M.A.Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, p. 361-375, **2008**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300005>

FRESCO-CALA, B.; MOMPÓ-ROSELLÓ, Ó.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; CÁRDENAS, S.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M. Carbon nanotube-modified monolithic polymethacrylate pipette tips for (micro)solid-phase extraction of antidepressants from urine samples. *Microchimica Acta*, v. 185, p. 1-7, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2659-4>

FRITZSCHE, M.; BLOM, G.; KEITEL, J.; GOETTSCHKE, A.; SEEGL, M.; LEICHT, S.; GUESSREGEN, B.; HICKERT, S.; REIFENBERG, P.; CIMELLI, A.; BARANOWSKI, R.; DESMARTIN, E.; BARRAU, E.; HARRISON, M.; BRISTOW, T.; O'NEILL, N.; KIRSCH, A.; KRUEGER, P.; SAAL, C.; MOUTON, B.; SCHLINGEMANN, J. NDMA analytics in metformin products: Comparison of methods and pitfalls. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 168, 106026, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106026>

GAŁKA, P.; KOWALONEK, J.; KACZMAREK, H. Thermogravimetric analysis of thermal stability of poly(methyl methacrylate) films modified with photoinitiators. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 1387-1394, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3446-z>

GAMA, M.R.; ROCHA, F.R.; BOTTOLI, C.B. Monoliths: synthetic routes, functionalization and innovative analytical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 115, p. 39-51, **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.020>

GIMÉNEZ-CAMPILLO, C.; PASTOR-BELDA, M.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; VIÑAS, P. Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 223, 121659, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121659>

GÉHIM, C.; O'NEILL, N.; MOORE, A.; HARRISON, M.; HOLMAN, S.W.; BLOM, G. Dispersant-first dispersive liquid-liquid microextraction (DF-DLLME), a novel sample preparation procedure for NDMA determination in metformin products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 2453-2462, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.016>

GOLOB, N.; PETERLIN, S.; ROŠKAR, R. NDMA formation due to active ingredient degradation and nitrite traces in drug product. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 1277-1286, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.007>

GROB, K. **Split and splitless injection for quantitative gas chromatography**: Concepts, processes, practical guidelines, sources of error. 4th ed. Weinheim: John Wiley & Sons, **2008**.

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, S.T.; MORGAN, S.L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1867-1874, **2010**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.047>

GUAN, H.; STEWART, K. Determination of explosives in water using disposable pipette extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, v. 47, p. 1434-1447, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.869826>

GUI, R.; JIN, H.; GUO, H.; WANG, Z. Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 100, p. 56-70, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.058>

HARMON, P. Ranitidine: a proposed mechanistic rationale for NDMA formation and a potential control strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 1220-1224, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.011>

HASEGAWA, C.; KUMAZAWA, T.; LEE, X.P. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 389, p. 563-570, **2007**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1460-3>

HASHEMI, S.H.; KAYKHAIL, M. Nanoparticle coatings for stir bar sorptive extraction, synthesis, characterization and application. *Talanta*, v. 221, 121568, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121568>

HE, J.X.; PAN, H.Y.; XU, L.; TANG, R.Y. Application of molecularly imprinted polymers for the separation and detection of aflatoxin. *Journal of Chemical Research*, v. 45, p. 400-410, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1177/1747519820980373>

HERRERA-GONZÁLEZ, A.M.; CALDERA-VILLALOBOS, M.; PÉREZ-MONDRAGÓN, A.A.; CUEVAS-SUÁREZ, C.E.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.A. Analysis of double bond conversion of photopolymerizable monomers by FTIR-ATR spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, v. 96, p. 1786-1789, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00659>

HOSSEN, M.R.; TALBOT, M.W.; KENNARD, R.; BOUSFIELD, D.W.; MASON, M.D. A comparative study of methods for porosity determination of cellulose based porous materials. *Cellulose*, v. 27, p. 6849-6860, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03257-9>

HU, T.; CHEN, R.; WANG, Q.; HE, C.; LIU, S. Recent advances and applications of molecularly imprinted polymers in solid-phase extraction for real sample analysis. *Journal of Separation Science*, v. 44, p. 274-309, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202000832>

HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 373, p. 23-30, **2002**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>

ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures - Step 5 - Revision 1. EMA/CHMP/ICH/804363/2022, versão de **22/12/2023**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>, acessada em dezembro, **2023**.

JAKAVULA, S.; NQOMBOLO, A.; MPUPA, A.; REN, J.; NOMNGONGO, P.N. Hybrid porous material supported in a cellulose acetate polymeric membrane for the direct immersion thin-film microextraction of parabens in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1705, 464187, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134860>

JANDERA, P. Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis - A review. *Journal of chromatography A*, v. 1313, p. 37-53, **2013**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.010>

JARDIM, I.C.S.F. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, p. 13-25, **2010**.

KADHEM, A.J.; GENTILE, G.J.; CORTALEZZI, M.M.F. Molecularly imprinted polymers (MIPs) in sensors for environmental and biomedical applications: A review. *Molecules*, v. 26, 6233, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26206233>

KALAUZ, A.; TIRINGER, K.V.; HORVÁTH, V.; KAPUI, I. Simultaneous determination of low molecular weight nitrosamines in pharmaceutical products by fast gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1708, 464323, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464323>

KARRAT, A.; AMINE, A. Solid-phase extraction combined with a spectrophotometric method for determination of Bisphenol - A in water samples using magnetic molecularly imprinted polymer. *Microchemical Journal*, v. 168, 106496, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106496>

KAYA, S.I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S.A. Molecularly imprinted polymers as highly selective sorbents in sample preparation techniques and their applications in environmental water analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 37, e00193, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00193>

LI, J.; ARNOLD, W.A.; HOZALSKI, R.M. Animal feedlots and domestic wastewater discharges are likely sources of N-nitrosodimethylamine (NDMA) precursors in midwestern watersheds. *Environmental Science & Technology*, in press, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c09251>

LI, Z.; WANG, J.; CHEN, X.; HU, S.; GONG, T.; XIAN, Q. A novel molecularly imprinted polymer-solid phase extraction method coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nitrosamines in water and beverage samples. *Food Chemistry*, v. 292, p. 267-274, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.036>

LIJINSKY, W.; CONRAD, E.; VAN DE BOGART, R. Carcinogenic nitrosamines formed by drug/nitrite interactions. *Nature*, v. 239, p. 165-167, **1972**. DOI: <https://doi.org/10.1038/239165b0>

LIU, J.; SONG, Q.; ZHENG, W.; JIA, W.; JIA, H.; NAN, Y.; LI, Y. Preparation of boronic acid and carboxyl-modified molecularly imprinted polymer and application in a novel chromatography mediated hollow fiber membrane to selectively extract glucose from cellulose hydrolysis. *Journal of Separation Science*, v. 45, p. 2415-2428, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202200090>

LU, X.; LI, X. Preparation of polyvinylidene fluoride membrane via a thermally induced phase separation using a mixed diluent. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, p. 1213-1219, **2009**. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.30184>

LUO, S.; WU, J.; HUANG, X. Molecularly imprinted monolith-based portable in-tip microextraction device for field specific extraction of triazine herbicides in aqueous samples followed by chromatographic quantification. *Journal of Chromatography A*, v. 1689, 463743, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463743>

LUO, Y.; YANG, L.; JIANG, L.; HUANG, C.; SHEN, X. Preparation of wax-based molecularly imprinted monolith for pipette-tip solid-phase extraction: a hybrid method. *Microchimica Acta*, v. 190, 151, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05726-x>

MAFRA, G.; SPUDEIT, D.; BROGNOLI, R.; MERIB, J.; CARASEK, E. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. *Journal of Chromatography B*, v. 1102-1103, p. 159-166, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.021>

MAJORS, R.E. Overview of sample preparation. *LCGC*, v. 33, p. 46-51, **2015**. <https://www.chromatographyonline.com/view/overview-sample-preparation>

MANSOUR, F.R.; WAHEED, S.; PAULL, B.; MAYA, F. Porogens and porogen selection in the preparation of porous polymer monoliths. *Journal of Separation Science*, v. 43, p. 56-69, **2020**. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900876>

MASINI, J.C.; NASCIMENTO, F.H.; VITEK, R. Porous monolithic materials for extraction and preconcentration of pollutants from environmental waters. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, e00112, **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00112>

MAYA, F.; PAULL, B. Recent strategies to enhance the performance of polymer monoliths for analytical separations. *Journal of Separation Science*, v. 42, p. 1564-1576, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201801126>

NASCIMENTO, F.H.; MASINI, J.C. Porous polymer monolithic columns to investigate the interaction of humic substances with herbicides and emerging pollutants by affinity chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 1288, 342183, **2024**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342183>

NAZDRAJIC, E.; SHIMELIS, O.I.; ROSS, M.J.; CHEN, Y.; CRAMER, H.; PAWLISZYN, J. Optimizing a high-throughput solid-phase microextraction system to determine the plasma protein binding of drugs in human plasma. *Analytical Chemistry*, v. 93, p. 11061-11065, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01986>

NDUNDA, E.N. Molecularly imprinted polymers - A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect: A mini review. *Journal of Molecular Recognition*, v. 33, e2855, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmr.2855>

NEMA, T.; CHAN, E.C.; HO, P.C. Applications of monolithic materials for sample preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 130-141, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.036>

NEVES, H.P.; FERREIRA, G.M.D.; FERREIRA, G.M.D.; LEMOS, L.R.; RODRIGUES, G.D.; LEÃO, V.A.; MAGESTE, A.B. Liquid-liquid extraction of rare earth elements using systems that are more environmentally friendly: Advances, challenges and perspectives. *Separation and Purification Technology*, v. 282, 120064, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.120064>

NGUYEN, T.D.; LEE, M.H.; LEE, G.H. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal*, v. 95, p. 113-119, **2010**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.11.009>

NIKAM, P.S.; SHIRSAT, L.N.; HASAN, M. Density and viscosity studies of binary mixtures of acetonitrile with methanol, ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, and 2-methylpropan-2-ol at (298.15, 303.15, 308.15, and 313.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 43, p. 732-737, **1998**. <https://doi.org/10.1021/je980028e>

NISCHANG, I.; CAUSON, T.J. Porous polymer monoliths: From their fundamental structure to analytical engineering applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 75, p. 108-117, **2016**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.013>

OLIVEIRA, T.C.; LANÇAS, F.M. Determination of selected herbicides in sugarcane-derived foods by graphene-oxide based disposable pipette extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1687, 463690, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463690>

PALMA, R.; PATEL, V.; FLORIAN, J.; KEIRE, D.; SELAYA, D.; STRAUSS, D.G.; ROUSE, R.; MATTA, M. K. A bioanalytical method for quantification of N-nitrosodimethylamine (NDMA) in human plasma and urine with different meals and following administration of ranitidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 1315-1323, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.026>

PARR, M.K.; JOSEPH, J.F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 164, p. 536-549, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.010>

PATEL, N.; GUPTA, K.R.; UMEKAR, M.J. An overview of monolithic column: types, parameters and applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 12(4-S), p. 223-231, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.22270/jddt.v12i4-S.5521>

PEREIRA-COELHO, M.; HAAS, I.C.S.; REINKE, C.K.; DOGNINI, J.; AMBONI, R.D.M.C.; VITALI, L.; MADUREIRA, L.A.S. A green analytical method for the determination of polyphenols in wine by dispersive pipette extraction and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 405, 134860, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134860>

PINTO, M.A.L.; SOUZA, I.D.; QUEIROZ, M.E.C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 139, p. 116-124, **2017**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.052>

PINTO, M.A.L.; QUEIROZ, M.E.C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, v. 7, p. 101-108, **2015**. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.019>

PŁOTKA-WASYLKA, J.; JATKOWSKA, N.; PASZKIEWICZ, M.; CABAN, M.; FARES, M.Y.; DOGAN, A.; GARRIGUES, S.; MANOUSI, N.; KALOGIOURI, N.; NOWAK, P.M.; SAMANIDOU, V.F.; DE LA GUARDIA, M. Miniaturized solid phase extraction techniques for different kind of pollutants analysis: State of the art and future perspectives-PART 1. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 162, 117034, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117034>

POTTER, O.G.; HILDER, E.F. Porous polymer monoliths for extraction: Diverse applications and platforms. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 1881-1906, **2008**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200800116>

PUBCHEM, disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodimethylamine#section=LogP>, acessada em fevereiro, **2024**.

RAFIQUE, N.; NAZIR, S.; AKRAM, S.; AHAD, K.; GOHAR, A.; ABBASI, S.T.; AHMED, I.; RAFIQUE, K. Screening of multiclass pesticide residues in honey by SPE-GC/MSD: a pilot study. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 190, p. 666-676, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7041-4>

RAHIMI, M.; BAHAR, S.; AMININASAB, S.M. Preparation of molecular imprinted polymer based on chitosan as the selective sorbent for solid-phase microextraction of phenobarbital. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2022, 9027920, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9027920>

RAMPEY, A.M.; UMPLEBY, R.J.; RUSHTON, G.T.; ISEMAN, J.C.; SHAH, R.N.; SHIMIZU, K.D. Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 1123-1133, **2004**. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac0345345>

REBELO, P.; COSTA-RAMA, E.; SEGURO, I.; PACHECO, J.G.; NOUWS, H.P.; CORDEIRO, M.N.D.; DELERUE-MATOS, C. Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 172, 112719, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112719>

RIBEIRO, L.F.; MASINI, J.C. Complexing porous polymer monoliths for online solid-phase extraction of metals in sequential injection analysis with electrochemical detection. *Talanta*, v. 185, p. 387-395, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.099>

SAMANIDOU, V.; KOVATSI, L.; FRAGOU, D.; RENTIFIS, K. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. *Bioanalysis*, v. 3, p. 2019-2046, **2011**. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.11.168>

SCHMIDTSDORFF, S.; NEUMANN, J.; SCHMIDT, A.H.; PARR, M.K. Risk assessment for nitrosated pharmaceuticals: A future perspective in drug development. *Archiv der Pharmazie*, v. 355, 2100435, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202100435>

SGROI, M.; VAGLIASINDI, F.G.; SNYDER, S.A.; ROCCARO, P. N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and its precursors in water and wastewater: A review on formation and removal. *Chemosphere*, v. 191, p. 685-703, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.089>

SHEN, R.; ANDREWS, S.A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: The role of pH. *Water research*, v. 47, p. 802-810, **2013**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.004>

SHI, Z.; LI, Q.; XU, D.; HUAI, Q.; ZHANG, H. Graphene-based pipette tip solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of carbamate pesticide residues in fruit juice. *Journal of Separation Science*, v. 39, p. 4391-4397, **2016**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201600498>

SHI, X.; WU, A.; QU, G.; LI, R.; ZHANG, D. Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs. *Biomaterials*, v. 28, p. 3741-3749, **2007**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.036>

SILVA, W.R.; COSTA, B.E.; BATISTA, A.D.; ALVES, V.N.; COELHO, N.M. Development of a disposable pipette extraction method using coffee silverskin as an adsorbent for chromium determination in wastewater samples by solid phase extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 33, p. 498-507, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210171>

SING, K.S.W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Applied Chemistry*, v. 54, p. 2201-2218, **1982**. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac198557040603>

SMIRNOVA, S.V.; LYSKOVITSEVA, K.A.; PLETNEV, I.V. Extraction and determination of synthetic food dyes using tetraalkylammonium based liquid-liquid extraction. *Microchemical Journal*, v. 162, 105833, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105833>

SONG, Z.; LI, J.; LU, W.; LI, B.; YANG, G.; BI, Y.; ARABI, M.; WANG, X.; MA, J.; CHEN, L. Molecularly imprinted polymers based materials and their applications in chromatographic and electrophoretic separations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 146, 116504, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116504>

SONG, Y.; PENG, J.; LI, K.; FENG, S.; QIN, W.; JIANG, J.; MA, J. Control of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation from N,N-dimethylhydrazine compounds by ozone-based advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, v. 452, 131374, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131374>

SORRIBES-SORIANO, A.; VALENCIA, A.; ESTEVE-TURRILLAS, F.A.; ARMENTA, S.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M. Development of pipette tip-based poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith for the extraction of drugs of abuse from oral fluid samples. *Talanta*, v. 205, 120158, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120158>

SUN, H.; FENG, J.; HAN, S.; JI, X.; LI, C.; FENG, J.; SUN, M. Recent advances in micro-and nanomaterial-based adsorbents for pipette-tip solid-phase extraction. *Microchimica Acta*, v. 188, p. 1-24, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04806-0>

SVEC, F. Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 902-924, **2010**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.073>

SVEC, F.; FRECHET, J.M. Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis. *Chemistry of materials*, v. 7, p. 707-715, **1995**. DOI: <https://doi.org/10.1021/cm00052a016>

SZYNKIEWICZ, D.; GEORGIEV, P.; ULENBERG, S.; BĄCZEK, T.; BELKA, M. Dispersive solid-phase extraction facilitated by newly developed, fully 3D-printed device. *Microchemical Journal*, v. 187, 108367, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108367>

TADEO, J.L.; PÉREZ, R.A.; ALBERO, B.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C. Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residues in soil. *Journal of AOAC International*, v. 95, p. 1258-1271, **2012**. DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Tadeo

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, p. 943-951, **2009**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>

TONG, S.; LIU, S.; WANG, H.; JIA, Q. Recent advances of polymer monolithic columns functionalized with micro/nanomaterials: synthesis and application. *Chromatographia*, v. 77, p. 5-14, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2564-x>

TUESUWAN, B.; VONGSUTILERS, V. Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: threat, impact, and control. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 110, p. 3118-3128, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.021>

VELAYATI, S.; SAADATI, F.; SHAYANI-JAM, H.; SHEKARI, A.; VALIPOUR, R.; YAFTIAN, M.R. Fabrication and evaluation of a molecularly imprinted polymer electrochemical nanosensor for the sensitive monitoring of phenobarbital in biological samples. *Microchemical Journal*, v. 174, 107063, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107063>

VILLA, C.C.; SÁNCHEZ, L.T.; VALENCIA, G.A.; AHMED, S.; GUTIÉRREZ, T.J. Molecularly imprinted polymers for food applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 111, p. 642-669, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.003>

WANG, J.; GUO, X. Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application and solving method. *Chemosphere*, v. 258, p. 127-139, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127279>

WEBBOOK, Livro de Química na Web. National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C62759&Mask=200>, acessada em setembro de **2023**.

WHITE, C.M. Understanding and preventing (N-nitrosodimethylamine) NDMA contamination of medications. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 54, p. 611-614, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1177/1060028019892222>

WU, B.; MUHAMMAD, T.; AIHEBAIER, S.; KARIM, K.; HU, Y.; PILETSKY, S. A molecularly imprinted polymer based monolith pipette tip for solid-phase extraction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in an aqueous sample. *Analytical Methods*, v. 12, p. 4913-4921, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0AY01587C>

YI, M.; CHENG, Y.; WANG, Z.; WANG, C.; HU, B.; HE, X. Effect of particle size and adsorption equilibrium time on pore structure characterization in low pressure N₂ adsorption of coal: An experimental study. *Advanced Powder Technology*, v. 31, p. 4275-4281, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appt.2020.09.004>

YU, S.; NG, F.L.; MA, K.C.C.; MON, A.A.; NG, F.L.; NG, Y.Y. Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 127, p. 2641-2647, **2013**. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.37514>

ZAJICKOVA, Z. Review of recent advances in development and applications of organic-silica hybrid monoliths. *Journal of Separation Science*, v. 46, 2300396, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202300396>

ZHONG, J.; BAI, L.; QIN, J.; WANG, J.; HAO, M.; YANG, G. *In situ* polymerization of monolith based on poly(triallyl isocyanurate-co-trimethylolpropane triacrylate) and its application in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, v. 53, p. 531-536, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu080>

ZHONG, J.; HAO, M.; LI, R.; BAI, L.; YANG, G. Preparation and characterization of poly(triallyl isocyanurate-co-trimethylolpropane triacrylate) monolith and its applications in the separation of small molecules by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1333, p. 79-86, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.072>

ZHU, T.; ROW, K.H. Preparation and applications of hybrid organic-inorganic monoliths: a review. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 1294-1302, **2012**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201200084>

Kannouma, R. E., Hammad, M. A., Kamal, A. H., & Mansour, F. R.. Miniaturization of Liquid-Liquid extraction; the barriers and the enablers. *Microchemical Journal*, 107863, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107863>

Wu, J. Y. D., Eserian, J. K., & Lombardo, M.. CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS COM NITROSAMINAS: RISCOS SANITÁRIOS E AÇÕES DE RECOLHIMENTO DE PRODUTOS NO BRASIL. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, 34(3), 260-265, **2022**. DOI: <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v34.e3.a2022.pp260-265>