

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniel da Silva Inácio

ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES
ENVOLVENDO ANTIBIÓTICOS
UMA CONTRIBUIÇÃO PARA O MAPEAMENTO DE
SOLUÇÕES PARA A REMOÇÃO DE ANTIBIÓTICOS
DOS EFLUENTES

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada e Industrial, orientada pela Professora Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro e pela Professora Ana Maria Telmo Dias Pereira Vicente Cabral, e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023

Daniel da Silva Inácio

**ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES
ENVOLVENDO ANTIBIÓTICOS**

UMA CONTRIBUIÇÃO PARA O MAPEAMENTO DE
SOLUÇÕES PARA A REMOÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DOS
EFLUENTES

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área
de especialização em Química Avançada e Industrial, variante
Desenvolvimento e Estratégia

Orientação

Professora Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro

Professora Doutora Ana Maria Telmo Dias Pereira Vicente Cabral

Setembro de 2023



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**

Agradecimentos

Ao recordar a minha infância lembro-me de um livro que moldou, de alguma forma, a minha maneira de ser e a perceção que tenho do mundo. “O Alquimista”, de Paulo Coelho, converge com o meu percurso académico e, ironicamente, ecoa com a minha área de estudo, a química. De forma breve, o livro conta a história de Santiago, um pastor andaluz que tem um sonho recorrente sobre um tesouro escondido no Egito. Guiado por esse sonho e pelo desejo de encontrar um significado para a sua vida, ele parte numa jornada de autodescoberta. Eventualmente, surge um alquimista que partilha uma lição de vida e perseverança: “O segredo da vida, porém, é cair sete vezes e levantar oito”. Os riscos são inerentes ao que nos é desconhecido e podem despertar receio, mas esse não deve ser o motivo para desistirmos de algo. A monotonia também se pode espalhar facilmente pelas nossas vidas, mas a mudança está sob o nosso controlo, no nosso foco e na forma como escolhemos viver. Ao fim do dia, as recompensas surgem na proporção da nossa atitude.

Ao longo deste percurso tive a oportunidade de contar com o apoio de várias pessoas e integrar grupos – NEQ/AAC, GE/AAC, OAUC, e Desconcertuna – que tornaram esta jornada tão especial. A todos eles, o meu sincero obrigado.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro, agradeço a disponibilidade e dedicação investidos no trabalho desenvolvido, assim como a motivação para solucionar as adversidades que foram surgindo ao longo do mesmo.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Maria Telmo Dias Pereira Vicente Cabral, agradeço a colaboração neste projeto científico.

À Professora Doutora Dina Maria Bairrada Murtinho agradeço a disponibilidade e ajuda que desde sempre ofereceu.

Ao Professor Doutor Artur José Monteiro Valente agradeço a orientação, paciência e dicas que foram cruciais para o meu enriquecimento académico e me ajudaram a crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Grupo de Fenómenos de Transporte em Polímeros da Universidade de Coimbra, os meus colegas de laboratório, agradeço o espírito de convivência e alegria, em especial ao Mestre Gianluca Utzeri, por todo o conhecimento transmitido e interesse despoletado na área.

A todos os meus amigos um enorme obrigado pelo companheirismo demonstrado e por terem tornado esta jornada tão especial, em particular aos amigos da terrinha, à Última Ceia e a todos os que têm acompanhado o meu desespero nos últimos tempos. À Mariana, por ser a minha grande companheira neste percurso académico e na vida.

João David, sei que não foi fácil ouvires-me falar da tese 24/7 e retribuíres constantemente apoio com sorrisos e acenos de cabeça, mesmo sem saberes o que era uma ciclodextrina. A capacidade de incentivar os outros, mesmo quando não partilhamos as mesmas experiências, é um traço admirável. Obrigado por estares comigo nos bons e maus momentos. És a maior inspiração :)

Aos meus primos, à tia Paula, à avó Conceição, ao meu irmão e ao meu Miguelito, agradeço por todos os momentos passados em família e pelo apoio imensurável.

É graças a vocês, pai e mãe, que concluo mais uma etapa esforçada, inspirado pelo vosso espírito trabalhador de que tanto me orgulho. Obrigado por me transmitirem essa e outras virtudes que me capacitaram a seguir as minhas escolhas e concretizar os meus objetivos. Obrigado pelo apoio nos piores momentos e por me fazerem acreditar que consigo dar mais de mim, mesmo quando estou desmotivado.

FRA!

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas e Símbolos	ix
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. Introdução.....	1
1.1. O Impacto dos Antibióticos no Meio Ambiente	1
1.2. Antibióticos	3
1.2.1. Sulfonamidas Sódicas	4
1.3. Remediação Ambiental: do Problema à Solução	6
1.3.1. Sistema Legislativo.....	6
1.3.2. Tratamento de Efluentes	6
1.3.3. Processos de Sorção	8
1.4. Química Supramolecular	10
1.4.1. Ciclodextrinas	12
1.4.2. Processos de Inclusão Molecular.....	17
1.4.3. Técnicas Utilizadas no Reconhecimento de Processos de Inclusão Molecular	18
1.4.4. Materiais Adsorventes à Base de Ciclodextrinas	19
1.4.5. Nanoesponjas	20
1.5. Objetivos da Tese.....	22
2. Difusão Isotérmica	23
2.1. Difusão Isotérmica em Sistemas Binários	26
2.2. Difusão Isotérmica em Sistemas Ternários	30
2.2.1. Sulfadiazina de Sódio (NaSD).....	31
2.2.2. Sulfamerazina de Sódio (NaSMR)	32

2.2.3.	Sulfametazina de Sódio (NaSMT)	33
2.2.4.	Análise dos Estudos de Difusão Isotérmica em Sistemas Ternários	34
2.3.	Determinação de Propriedades de Transporte das Sulfonamidas de Sódio (NaSAs).....	40
3.	Espetroscopia de Absorção Ultravioleta–visível	45
3.1.	Interação entre CDs e NaSAs por UV–vis.....	47
4.	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	51
4.1.	Interação entre CDs e NaSAs por ¹ H–RMN	53
5.	Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	61
5.1.	Interação entre CDs e NaSAs por ITC.....	63
6.	Nanoesponjas de Ciclodextrinas.....	65
6.1.	Síntese e Caracterização das Nanoesponjas de Ciclodextrinas	65
6.2.	Ensaio de Adsorção das Nanoesponjas de Ciclodextrinas	73
7.	Conclusões e Perspetivas Futuras	81
8.	Secção Experimental	87
8.1.	Materiais.....	87
8.2.	Instrumentação	88
8.3.	Métodos	89
8.3.1.	Difusão Intermolecular em líquidos.....	89
8.3.2.	Espetroscopia Ultravioleta–visível.....	90
8.3.3.	Ressonância Magnética Nuclear	90
8.3.4.	Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	91
8.3.5.	Síntese e Caracterização das Nanoesponjas de Ciclodextrinas	91
8.3.6.	Ensaio de Adsorção	93

Índice de Figuras

Figura 1 Estimativa do número de mortes provocadas por bactérias multiresistentes em 2050. Adaptado de [19].	3
Figura 2 Estrutura molecular de três derivados (NaSD, NaSMR, NaSMT) de sulfonamidas sódicas: $R^1 = H$ e $R^2 = H$ para NaSD; $R^1 = CH_3$ e $R^2 = H$ para NaSMR; $R^1 = CH_3$ e $R^2 = CH_3$ para NaSMT.	4
Figura 3 Esquema dos processos realizados em ETARs. Adaptado de [45].	8
Figura 4 Categorias principais da química supramolecular: A) reconhecimento molecular; B) montagem molecular.	11
Figura 5 Estrutura molecular de algumas das moléculas hospedeiras mais comuns documentadas na literatura.	12
Figura 6 Estrutura molecular de A) α -CD, B) β -CD e C) γ -CD.	14
Figura 7 Diferentes abordagens desenvolvidas para preparar materiais à base de CD funcionalizadas: A) polímeros de CDs; B) imobilização de CDs em matrizes insolúveis; C) automontagem de CD em matrizes insolúveis [83].	19
Figura 8 Representação esquemática de NSs de CDs. ● Zona hidrofílica externa; ● Zona hidrofóbica interna; ● Analito; ● Material reticulante genérico. Adaptado de [74].	21
Figura 9 Perfil de difusão radial de um soluto num tubo de dispersão: 1) tubo capilar; 2) perfil de velocidade em fluxo laminar; 3) injeção do soluto; 4) difusão radial.	26
Figura 10 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + α -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (►) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $dm^3 mol^{-1}$.	39
Figura 11 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + β -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (►) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $dm^3 mol^{-1}$.	39
Figura 12 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + β -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (►) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $dm^3 mol^{-1}$.	40
Figura 13 A) Espectros de absorção UV-vis da NaSMR ($0,005 mmol dm^{-3}$) na presença de diferentes concentrações de β -CD ordenadas de 1 a 5: 0 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—) e 12 (—) $mmol dm^{-3}$, respetivamente; B) Ajuste linear da equação (3.2) aos dados experimentais obtidos por UV-vis com regressão $1\Delta A = 207,489 1[\beta - CD] + 5,475$ e $R^2 = 0,956$.	48

Figura 14 A) Espectros de absorção UV-vis da NaSMR ($0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$) na presença de diferentes concentrações de γ -CD ordenadas de 1 a 5: 0 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—) e 12 (—) mmol dm^{-3} , respectivamente; B) Ajuste linear da equação (3.2) aos dados experimentais obtidos por UV-vis com regressão $1\Delta A = -52,643 \text{ } 1[\gamma - \text{CD}] - 4,915$ e $R^2 = 0,983$	48
Figura 15 Representação espacial dos prótons na estrutura de cone truncado das CDs.....	52
Figura 16 Representação da posição dos prótons na estrutura molecular da A) β -CD e B) NaSMR. 54	
Figura 17 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de 5 mmol dm^{-3} β -CD em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$	55
Figura 18 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de 5 mmol dm^{-3} NaSMR em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$	55
Figura 19 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de $(5 : 5) \text{ mmol dm}^{-3}$ β -CD/NaSMR em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$	56
Figura 20 Expansão dos espectros de ^1H -RMN ($3,46$ a $3,94 \text{ ppm}$) das soluções em D_2O de A) $[\beta\text{-CD}] = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$; B) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (3,0/5,0) = 0,6$; C) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (5,0/5,0) = 1,0$; D) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (7,5/5,0) = 1,5$; E) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (10,0/5,0) = 2,0$; F) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (12,5/5,0) = 2,5$; G) $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (15,0/5,0) = 3,0$	58
Figura 21 Ajuste não linear da equação (4.6) aos dados experimentais de H_3 obtidos por ^1H -RMN na figura 20, com $R^2 = 0,978$	59
Figura 22 Representação hipotética de um complexo de inclusão entre a β -CD e a NaSMR segundo os resultados obtidos nos estudos de ^1H -RMN.....	60
Figura 23 Representação tradicional da isotérmica de Wiseman, com o parâmetro c de Wiseman igual a: 1000 (—), 100 (—), 10 (—), 1 (—), $0,1$ (—) e $0,01$ (—). Adaptado de [127]......	63
Figura 24 Termograma obtido através da diluição em água de A) 1 mmol dm^{-3} β -CD e B) 1 mmol dm^{-3} NaSMR.....	63
Figura 25 Termograma obtido através da titulação de 1 mmol dm^{-3} NaSMR para 5 mmol dm^{-3} β -CD.....	64
Figura 26 Esquema sintético das NSs A) $\text{CD}-am_6\text{-CD}$, B) $\text{CD}-am_6=\text{GLT}=am_6\text{-CD}$ e C) $\text{CD}-am_6\text{-GLT}-am_6\text{-CD}$	67
Figura 27 Espectro de ^1H -RMN de I-CD em DMSO ($\delta = 2,5 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$	68
Figura 28 Espectro de ^1H -RMN de $am_6\text{-CD}$ em DMSO ($\delta = 2,5 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$	68
Figura 29 Espectros de infravermelho de I-CD (—), $am_6\text{-CD}$ (—), NS $\text{CD}-am_6\text{-CD}$ (—) e NS $\text{CD}-am_6\text{-GLT}-am_6\text{-CD}$ (—).....	69

Figura 30 Fotografias das NSs A) $CD-am_6=GLT=am_6-CD$ e B) $CD-am_6-GLT-am_6-CD$	69
Figura 31 Termogramas (linha contínua) e respectivos dTG (linha tracejada) das NSs A) $CD-am_6-CD$ sintetizada por aquecimento com micro-ondas (—) e $CD-am_6-CD$ sintetizada por aquecimento convencional (—), B) $CD-am_6=GLT=am_6-CD$ (—) e C) $CD-am_6-GLT-am_6-CD$ (—).	71
Figura 32 Fotografias das NSs sintetizadas por diferentes fontes de aquecimento: A) Micro-ondas; B) Convencional.	73
Figura 33 Curva de calibração de NaSD em água obtida por Uv-vis a 260 nm.	75
Figura 34 Curva de calibração de NaSMR em água obtida por Uv-vis a 260 nm.	75
Figura 35 Curva de calibração de NaSMT em água obtida por Uv-vis a 260 nm.	76
Figura 36 Efeito da razão sólido/líquido na capacidade e eficiência de adsorção das NaSAs (NaSD, NaSMR e NaSMT) a 25 °C, por parte das NS A ($CD-am_6-CD$), NS B ($CD-am_6=GLT=am_6-CD$) e NS C ($CD-am_6-GLT-am_6-CD$).	77
Figura 37 Eficiências de adsorção (i.) e isotérmicas ajustadas pela equação de Freundlich (25 °C) (ii.) para a A) NS $CD-am_6-CD$ e B) NS $CD-am_6=GLT=am_6-CD$	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 Características físico-químicas de três derivados de NaSAs (NaSD, NaSMR, NaSMT) [27].	4
Tabela 2 Propriedades físico-químicas da α -CD, β -CD e γ -CD [62].	15
Tabela 3 Coeficientes de difusão limite de NaSD, NaSMR e NaSMT em água a 298,15 K e 101,3 kPa.	27
Tabela 4 Coeficientes de difusão limite de α -CD, β -CD e γ -CD em água a 298,15 K e 101,3 kPa [102–104].	28
Tabela 5 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSD em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.	31
Tabela 6 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSMR em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.	32
Tabela 7 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSMT em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.	33
Tabela 8 Razões máximas de D_{12}/D_{22} e D_{21}/D_{11} para cada sistema de NaSA com CDs.	36
Tabela 9 Coeficientes de difusão limite para os diferentes complexos considerados, j , no sistema ternário.	38
Tabela 10 Parâmetros de ^1H -RMN da β -CD na ausência e na presença de NaSMR a 298,15 K.	56
Tabela 11 Parâmetros de ^1H -RMN da NaSMR na ausência e na presença de β -CD a 298,15 K.	57
Tabela 12 Parâmetros obtidos por TGA para as NS A (NSs CD- α -CD sintetizada com aquecimento por micro-ondas), NS A' (NSs CD- α -CD sintetizada com aquecimento convencional), NS B (CD- α -GLT= α -CD) e NS C (CD- α -GLT- α -CD).	72
Tabela 13 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.	75
Tabela 14 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.	75
Tabela 15 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.	76
Tabela 16 Parâmetros obtidos no ajuste com a equação de Freundlich (25 °C) para a adsorção de NaSMR em água com NS CD- α -CD e CD- α -GLT= α -CD; otimiza relação S/L de 1,0 mg mL ⁻¹	79

Abreviaturas e Símbolos

As abreviaturas utilizadas ao longo deste trabalho encontram-se na seguinte lista:

$^1\text{H-RMN}$	Ressonância magnética nuclear de próton
$\alpha\text{-CD}$	Alfa-ciclodextrina
$\beta\text{-CD}$	Beta-ciclodextrina
$\gamma\text{-CD}$	Gama-ciclodextrina
$\delta\text{-CD}$	Delta-ciclodextrina
am_6	Hexano-1,6-diamina
$\text{am}_6\text{-CD}$	Beta-ciclodextrina funcionalizada com hexano-1,6-diamina
AOP	Processo de oxidação avançado (<i>Advanced Oxidation Process</i>)
ARG	Gene resistente a antibiótico (<i>Antibiotic Resistance Genes</i>)
BET	Análise de área superficial (método de Brunauer-Emmett-Teller)
CD	Ciclodextrina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
dTG	Primeira derivada da perda de massa em ordem à temperatura
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – refletância total atenuada (<i>Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance</i>)
GLT	Glutaraldeído
HOMO	Orbital molecular de maior energia ocupada (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HP-β-CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
I-CD	Beta-ciclodextrina funcionalizada com iodo

ITC	Calorimetria de titulação isotérmica (<i>Isothermal titration calorimetry</i>)
LOD	Limite de deteção (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>Limit of quantification</i>)
LUMO	Orbital molecular de menor energia não ocupada (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MW	Micro-ondas (<i>Microwave</i>)
NaSA	Sulfonamida de sódio
NaSD	Sulfadiazina de sódio
NaSMR	Sulfamerazina de sódio
NaSMT	Sulfametazina de sódio
NS	Nanoesponja (<i>Nanosponge</i>)
NS	Nanoesponja resultante da polimerização da
CD-am₆-CD	beta-ciclodextrina com hexano-1,6-diamina
NS	Nanoesponja resultante da polimerização da
CD-am₆=GLT=am₆-CD	beta-ciclodextrina com hexano-1,6-diamina e glutaraldeído
NS	Nanoesponja resultante da polimerização da
CD-am₆-GLT-am₆-CD	beta-ciclodextrina com hexano-1,6-diamina e glutaraldeído e reduzida com borohidreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PXRD	Difração de raios-X em pó (<i>Powder X-ray diffraction</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
SA	Sulfonamida
SD	Sulfadiazina
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (<i>Scanning electron microscopy</i>)
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfametazina
TGA	Análise termogravimétrica (<i>Thermogravimetric analysis</i>)
UV-vis	Ultravioleta-visível

A simbologia utilizada ao longo deste trabalho encontra-se na seguinte lista:

ε	Absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
λ	Comprimento de onda (nm)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo (nm)
λ^0	Condutividade limite ($\text{S m}^2 \text{ mol}^{-1}$)
∂	Derivada parcial
δ	Desvio químico (ppm)
σ	Estimativa de incerteza associada ao parâmetro (erro padrão)
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs (kJ mol^{-1})
ΔH	Varição da entalpia (kJ mol^{-1})
ΔS	Varição da entropia ($\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
η	Viscosidade
A	Absorvância
b_1	Parâmetro polinomial de primeira ordem (declive da reta de ajuste) (L mg^{-1})
C	Concentração (mol dm^{-3})
C_0	Concentração de adsorvato inicial em fase líquida (mg L^{-1})
C_e	Concentração de adsorvato no equilíbrio em fase líquida (mg L^{-1})
C.V.	Coefficiente de variação da média (imprecisão) (%)
D	Coefficiente de difusão ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
F	Constante de Faraday (96485 C mol^{-1})
J	Constante de acoplamento (Hz)
k_B	Constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
K	Constante de associação ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)
K_F	Constante de Freundlich ($\text{mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$)
m	Massa (g)
n_F	Fator de heterogeneidade da superfície (modelo de Freundlich)
pH	Potencial de hidrogénio iónico
Q	Eficiência de remoção (%)
q_e	Quantidade de adsorvato sequestrado no adsorvente no equilíbrio (mg g^{-1})
q_m	Capacidade máxima de adsorção pelo modelo de Langmuir (mg g^{-1})

R	Constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
R^2	Coefficiente de determinação
R_{hi}	Raio hidrodinâmico (Å)
S/L	Sólido/líquido (mg mL^{-1})
S_D	Desvio padrão (<i>Standard deviation</i>)
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$ ou K)
$T_{\text{máx}}$	Temperatura de degradação máxima, correspondente ao mínimo da primeira derivada da perda de massa em ordem à temperatura ($^{\circ}\text{C}$).
V	Volume (mL ou L)
X	Fração molar
z_i	Valência algébrica da espécie iônica i

Resumo

A resistência antimicrobiana aos antibióticos é um problema de saúde pública crescente em todo o mundo. O uso generalizado de antibióticos faz com que estes sejam considerados um novo grupo de poluentes ambientais, com um papel relevante na indução e disseminação de genes resistentes a antibióticos (ARGs) em vários habitats aquáticos. Os corpos de águas superficiais funcionam como um dos pontos críticos para a transferência de ARGs para o Homem, contribuindo para o aumento da resistência destes aos antibióticos. A presença de antibióticos nos diferentes corpos de água deve-se ao facto de serem solúveis, exibirem baixa volatilidade e serem dificilmente removidos através das atuais estratégias/tecnologias usadas nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Neste sentido, torna-se urgente desenvolver novas e eficientes tecnologias para a remoção de antibióticos e, conseqüentemente, de ARGs da água, a fim de evitar a propagação da resistência aos antibióticos.

Neste projeto foi estudada a interação entre ciclodextrinas (CDs) (α -CD, β -CD e γ -CD) e antibióticos de sulfonamidas de sódio (NaSAs) (NaSD, NaSMR e NaSMT), de forma a obter informações acerca dos complexos supramoleculares formados e otimizar o desenvolvimento de materiais adsorventes específicos, nanoesponjas (NSs) de β -CD (CD- am_6 -CD, CD- am_6 -GLT- am_6 -CD e CD- am_6 -GLT- am_6 -CD), para a sua aplicação em remediação ambiental através da remoção de NaSAs da água.

Através da difusão isotérmica em líquidos (método de dispersão de Taylor), registaram-se fluxos acoplados contra-corrente que sugerem a formação de complexos entre CDs e NaSAs. A NaSMR apresenta a maior interação com as CDs estudadas, tendo-se obtido um valor de $D_{12} \approx -1,45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ com a γ -CD. Uma mole de γ -CD consegue contra-transportar 0,301 mol de NaSMR. Os raios hidrodinâmicos (R_{hi}) das SA^- mostraram que a cavidade da β -CD e γ -CD apresentam dimensões que capacitam a acomodação de uma maior parte da estrutura dos iões SA^- em água. A estimativa das constantes de associação para a NaSMR vai até $10 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ com a α -CD, até $20 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ com a β -CD e até $30 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ com a γ -CD. Nos estudos de UV-vis foram registadas alterações nos espectros da NaSMR com a adição de quantidades crescentes de β -CD e γ -CD, indicando uma mudança do microambiente da NaSMR como consequência da sua complexação na cavidade das CDs. As tendências relatadas demonstram que a β -CD e a γ -CD interagem com a NaSMR por processos diferentes. Através do método de Benesi-Hildebrand

obtiveram-se constantes de associação de $26 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ para o sistema β -CD + NaSMR e $93 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ para o sistema γ -CD + NaSMR. A técnica ^1H -RMN revelou que a adição de NaSMR à β -CD provoca uma alteração no ambiente químico dos prótons internos da β -CD (H_3 e H_5) e dos prótons da NaSMR, principalmente do próton H_A (anel A da NaSMR), sugerindo a inclusão parcial deste na cavidade da β -CD. Também se observou uma variação da constante de acoplamento do próton H_A , o que sugere que a interação entre as duas espécies provoca uma alteração conformacional na estrutura da NaSMR, como foi sugerido nos estudos de UV-vis. Um ajuste não linear dos dados obtidos permitiu estimar uma constante de associação para o sistema β -CD + NaSMR de $99 \pm 60 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Através de ITC não foi possível detetar interação entre NaSAs e CDs, uma vez que a técnica mostra dificuldades em detetar a formação de complexos supramoleculares pouco estáveis, com constantes de associação inferiores a $10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, como é o caso dos sistemas estudados.

Procedeu-se à síntese das NSs com β -CD. A eficiência de substituição dos precursores foi determinada por ^1H -RMN, as estruturas químicas foram caracterizadas por FTIR-ATR e a estabilidade térmica das NSs foi avaliada por TGA. Nos ensaios de adsorção verificou-se que o aumento da razão sólido/líquido (S/L) levou a um aumento das eficiências de remoção e a uma diminuição das capacidades de adsorção, respetivamente: 5,0% a 28,7% e $2,1 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ para a NS CD-am₆-CD; 9,7% a 49,9% e $14,9 \text{ mg mL}^{-1}$ a $1,8 \text{ mg mL}^{-1}$ para a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD; 6,7% a 66,1% e $13,0 \text{ mg mL}^{-1}$ a $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ para a NS CD-am₆-GLT-am₆-CD. Esta ordem de eficiência é proporcional à quantidade de grupos disponíveis na estrutura das NSs para formar ligações de hidrogénio. O modelo de Freundlich explica a variação dos dados obtidos em estudos com a NaSMR, tendo-se obtido os parâmetros $n_F = 0,70$ e $K_F = 0,11 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ para a NS CD-am₆-CD e $n_F = 1,23$ e $K_F = 3,74 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ para a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD. As diferenças nestes valores revelam diferenças nas superfícies envolvidas na adsorção, sugerindo que com a NS CD-am₆-CD ocorre um processo de fisissorção cooperativa em multicamadas de NaSMR, através de interações eletrostáticas (desfavoráveis), enquanto o mecanismo de adsorção da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD parece consistir um processo essencialmente controlado por quimissorção em multicamadas de NaSMR, justificado por pontes de hidrogénio (favoráveis).

Palavras-chave: Genes resistentes a antibióticos; Sulfonamidas de sódio; Ciclodextrinas; Complexos supramoleculares; Nanoesponjas; Remediação ambiental.

Abstract

Antimicrobial resistance to antibiotics is a growing public health problem worldwide. The widespread use of antibiotics makes them be considered a new group of environmental pollutants, with a relevant role in the induction and propagation of antibiotic resistance genes (ARGs) in several aquatic habitats. Surface water bodies act as one of the critical points in the transfer of ARGs to humans, contributing to their increased resistance to antibiotics. The presence of bacteria in different water bodies occurs due to the fact that they are soluble, exhibit low volatility and are hardly removed through current strategies/technologies used in wastewater treatment plants (WWTPs). In this regard, the development of new and efficient technologies becomes urgent for the removal of antibiotics and, consequently, ARGs from water, in order to prevent the spread of resistance to antibiotics.

In this project, the interaction between cyclodextrins (CDs) (α -CD, β -CD and γ -CD) and sodium sulfonamide antibiotics (NaSAs) (NaSD, NaSMR and NaSMT) was studied in order to obtain informations about supramolecular complexes formation and to optimize the development of specific adsorbent materials, β -CD nanosponges (NSs) (CD- am_6 -CD, CD- am_6 =GLT= am_6 -CD and CD- am_6 -GLT- am_6 -CD), for its application in environmental remediation through the removal of NaSAs from water.

Through isothermal diffusion in liquids, coupled countercurrent flows were detected, suggesting the formation of complexes between CDs and NaSAs. NaSMR shows the greatest interaction with CDs studied, have been obtained the value of $D_{12} \approx -1,45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ with γ -CD. One mole of γ -CD is able to counter-transport 0,301 mol of NaSMR. The hydrodynamic radii (R_{hi}) of SA^- showed that the cavity of β -CD and γ -CD presents dimensions that enable the accommodation of a greater part of the SA^- ions structure in water. The estimated binding constants for NaSMR range up to $10 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ with α -CD, up to $20 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ with β -CD, and up to $30 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ with γ -CD. In UV-vis studies were recorded changes in the NaSMR spectra with the addition of increased amounts of β -CD and γ -CD, indicating a change in the NaSMR microenvironment as a consequence of its complexation in the CD cavity. The reported trends manifest a different process of interaction of β -CD and γ -CD with NaSMR. Using the Benesi-Hildebrand method, binding constants of $26 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ were obtained for the β -CD + NaSMR system and $93 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ for the γ -CD + NaSMR system. $^1\text{H-NMR}$ technique revealed that the addition of NaSMR to β -CD induces a change in the chemical environment of the internal

protons of β -CD (H₃ and H₅) as well as the protons of NaSMR, mainly the H_A proton (ring A of NaSMR), suggesting its partial inclusion in the β -CD cavity. A variation in the H_A proton coupling constant was also detected, implying that the interaction between the two species generates a conformational change in the NaSMR structure, as suggested in the UV-vis studies. A non-linear adjustment of the obtained data allowed the deduction of a binding constant for the β -CD + NaSMR system of $99 \pm 60 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Through ITC, it was not possible to detect the interaction between NaSAs and CDs, since this technique shows some difficulties in the detection of not very stable complexes formed, with binding constants lower than $10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, such as the systems that are being studied. since the technique shows difficulties detecting the formation of unstable supramolecular complexes, with binding constants lower than $10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, such as the systems being studied.

The synthesis of NSs was proceeded with β -CD. The substitution efficiency of precursors was determined by ¹H-NMR, chemical structures were characterized by FTIR-ATR and thermal stability of NSs was evaluated with TGA. In adsorption tests it was reported that an increase in the solid/liquid ratio (S/L) led to an increase in the removal efficiencies and a decrease in the adsorption capacities, respectively: 5,0% to 28,7% and 2,1 mg mL⁻¹ to 0,2 mg mL⁻¹ for NS CD-am₆-CD; 9,7% to 49,9% and 14,9 mg mL⁻¹ to 1,8 mg mL⁻¹ for NS CD-am₆=GLT-am₆-CD; 6,7% to 66,1% and 13,0 mg mL⁻¹ to 1,2 mg mL⁻¹ for NS CD-am₆-GLT-am₆-CD. This order of efficiency is proportional to the amount of available groups in the structure of NSs that are able to form hydrogen bonds. Freundlich model explains the variation in the obtained data in studies with NaSMR, having been obtained the parameters $n_F = 0,70$ and $K_F = 0,11 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ for NS CD-am₆-CD and $n_F = 1,23$ and $K_F = 3,74 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ for NS CD-am₆=GLT-am₆-CD. The differences in these values reveal differences of the surfaces involved in the adsorption, indicating that with NS CD-am₆-CD there is a process of cooperative physisorption with NaSMR multilayers through electrostatic interactions (unfavorable), while the adsorption mechanism of NS CD-am₆=GLT-am₆-CD seems to consist in a process essentially controlled by NaSMR multilayer chemisorption, justified by hydrogen bonds (favorable).

Keywords: Antibiotic resistant genes; Sodium sulfonamides; Cyclodextrins; Supramolecular complexes; Nanosponges; Environmental remediation.

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. O Impacto dos Antibióticos no Meio Ambiente

Os séculos XX e XXI são marcados pela procura global de uma melhor qualidade de vida. Os esforços investidos para cumprir esse desejo fizeram com que as indústrias se tornassem numa das partes cruciais da sociedade moderna e a geração de resíduos um resultado inevitável das atividades de desenvolvimento [1], pelo que a eliminação de poluentes e a manutenção da qualidade da água, do solo e do ar representam desafios alarmantes que devem ser tidos como prioritários. Neste sentido, surge em 2019 o Pacto Ecológico Europeu, um pacote de propostas que pretende combater estas adversidades ao transformar a União Europeia numa economia moderna e eficiente na utilização dos recursos [2]. Uma das principais propostas consiste no “Rumo à poluição zero na água, no ar e no solo” [3]. O asseguramento adequado das águas residuais exigirá investimentos superiores a 200 mil milhões de euros nos próximos anos e inclui o desenvolvimento de tecnologias económicas de remediação simples e fáceis de operar. Apesar disso, 100 cidades da União Europeia continuam a não cumprir as normas em matéria de qualidade do ar e ainda há cerca de 37 milhões de pessoas cujos efluentes domésticos não recebem tratamento adequado [4]. Vários parâmetros, como a quantidade, composição, concentração, perigo, custo, toxicidade, grau de tratamento e tempo de permanência têm dificultado a remoção de poluentes até ao limite desejável [5]. Mais alarmante é a verificação do aumento da resistência destes poluentes e o impacto que poderão provocar realmente na saúde humana [6]. No entanto, para compreender melhor esta situação é necessário recuar um pouco no tempo.

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, revolucionou a forma pela qual a medicina tratava as infeções bacterianas. Ao estudar bactérias do tipo *Staphylococcus* percebeu que a sua amostra tinha sido contaminada por algum tipo de fungo e, ao investigar o bolor produzido, descobriu que se tratava do género *Penicillium* [7]. Este acontecimento abriu o caminho para a descoberta de novos antibióticos e proporcionou a cura de patologias infecciosas que constituíam a principal causa de morte da época. Os testes clínicos da penicilina tiveram início em 1941 e, já em 1945, é atribuído o prémio Nobel da medicina a Alexander Fleming. No seu discurso de aceitação alertou para os perigos da resistência bacteriana associados ao uso excessivo deste tipo de substâncias [8] e pouco tempo depois,

em 1948, assistiu-se a uma pandemia global provocada pela bactéria *Staphylococcus* resistente à penicilina [9].

Atualmente, os dados de 76 países mostraram que o consumo global total de antibióticos aumentou de 21,1 para 34,8 bilhões de doses diárias entre 2000 e 2015 [10]. Assiste-se a um consumo excessivo, acentuado pelo seu uso indiscriminado em automedicação, interrupção precoce do tratamento, descarte em locais impróprios [11] e no uso descontrolado das indústrias para promover altas eficiências de produção [12]. Adicionalmente, como o metabolismo de seres humanos e animais apenas tem a capacidade de absorver parcialmente este tipo de substâncias (< 25%) [13], a sua excreção na forma de metabólitos tem contribuído para a acumulação e permanência destes resíduos no meio ambiente, os quais são a principal causa da proliferação de genes resistentes a antibióticos (ARG) [13,14].

A detecção de resíduos de antibióticos e ARGs tem sido observada em solos, águas superficiais, águas subterrâneas, esgotos domésticos e hospitalares e até em água potável, indicando que a poluição ambiental por antibióticos é generalizada [15,16]. A propagação de ARGs deve-se à contínua exposição das bactérias a resíduos contendo antibióticos, fazendo com que desenvolvam mecanismos de resistência [17]. A ocorrência destas mudanças nos processos naturais de transferência de ácido desoxirribonucleico (DNA) entre espécies bacterianas faz com que a ação dos antibióticos se torne ineficaz devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana [18]. Conseqüentemente, torna-se cada vez mais difícil tratar infecções, surgindo novamente a ameaça prévia ao descobrimento dos antibióticos: o aumento do risco de propagação das infecções e o seu agravamento que levará ao aumento do número de mortes.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as bactérias multiresistentes fazem 700.000 vítimas anualmente [19] e prevê-se que um panorama geral para 2050 (figura 1) com a ocorrência da morte de uma pessoa a cada três segundos [20]. Parte da solução reside no desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, não surgiu uma nova classe de antibióticos desde a década de 1980 [21] e, atualmente, seria necessário desenvolver agentes antibacterianos ainda mais eficazes, mas qualquer novo antibiótico necessitaria de ser barato e raramente usado para minimizar o risco da resistência bacteriana [22]. Sem ferramentas eficazes para a prevenção e tratamento adequado destas infecções resistentes ao efeito de antibióticos, é importante apostar em outras metodologias que complementem a atenuação deste problema.

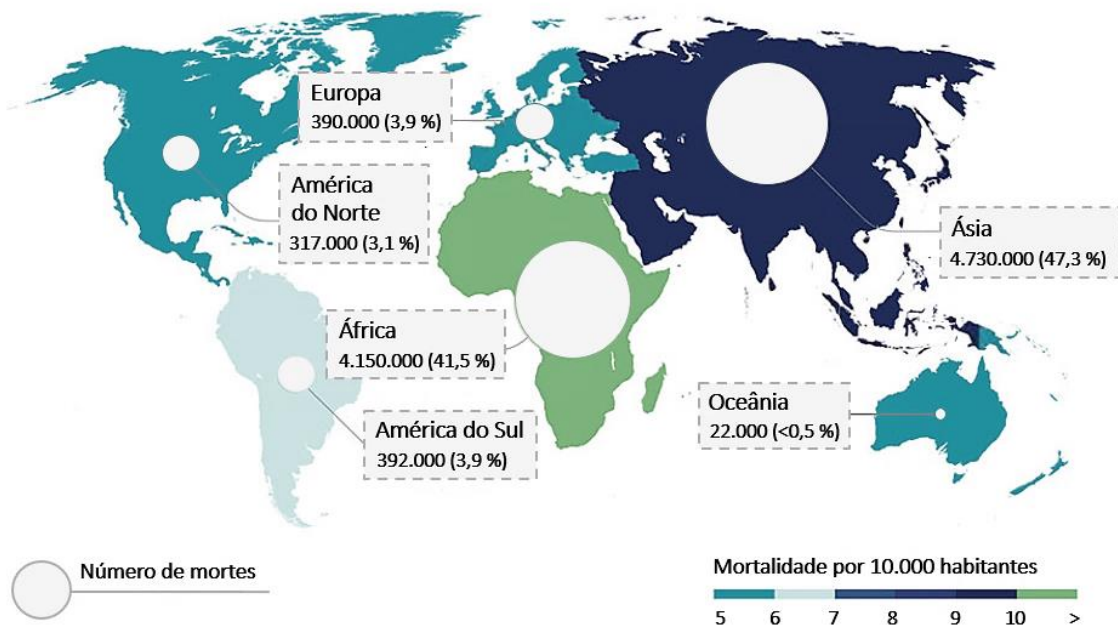


Figura 1 Estimativa do número de mortes provocadas por bactérias multiresistentes em 2050. Adaptado de [19].

1.2. Antibióticos

Entende-se por antibiótico todos os compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos que podem matar ou inibir o crescimento ou a atividade metabólica de bactérias, promovendo a destruição destes micro-organismos [23]. No decorrer dos anos, a expansão dos antibióticos foi notória devido ao alargamento do seu espectro de aplicabilidade, passando a ser utilizados, principalmente, na indústria farmacêutica, pecuária, agricultura e aquicultura [24].

É possível classificar os antibióticos segundo os alvos morfológicos que atingem dentro da célula bacteriana e a interferência que induzem no processo de síntese proteica, uma vez que as proteínas intervêm em todos os processos bacterianos. Atualmente, existem cerca de 10 classes principais de antibióticos que possuem mecanismos únicos de ação e espectros de atividade contra diferentes tipos de bactérias, de acordo com a sua estrutura química: aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicóis, glicoproteínas, macrolídeos, nitromidazólicos, polipeptídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclínas. Esta diversidade é fundamental para a eficácia dos antibióticos, já que diferentes doenças e circunstâncias requerem diferentes tipos de antibióticos [25].

1.2.1. Sulfonamidas Sódicas

Os antibióticos de sulfonamidas (SAs) foram os primeiros agentes antibacterianos usados clinicamente e a sua aplicação é relatada desde 1935 [26]. São amidas de ácidos sulfônicos, com a fórmula $-\text{SO}_2\text{NRR}'-$, onde um átomo central de enxofre, com dois oxigénios duplamente ligados, se encontra também ligado a um grupo anilina e a um átomo de azoto. Este átomo de azoto está ligado a um grupo piridina, onde os grupos R^1 e R^2 podem ser grupos hidrogénio, alquil, aril ou heteroaril. A sulfadiazina de sódio (NaSD), sulfamerazina de sódio (NaSMR) e a sulfametazina de sódio (NaSMT) são três derivados das sulfonamidas sódicas que diferem estruturalmente pela presença de nenhum, um ou dois substituintes metil no anel piridínio, respetivamente (figura 2). Na tabela 1 estão presentes algumas características físico-químicas das sulfonamidas de sódio (NaSAs) previamente mencionadas [27]

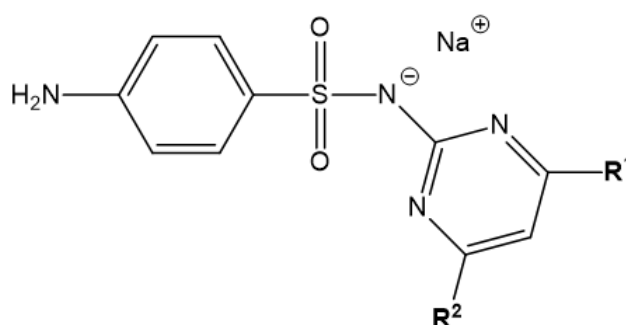


Figura 2 Estrutura molecular de três derivados (NaSD, NaSMR, NaSMT) de sulfonamidas sódicas: $\text{R}^1 = \text{H}$ e $\text{R}^2 = \text{H}$ para NaSD; $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ e $\text{R}^2 = \text{H}$ para NaSMR; $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ e $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ para NaSMT.

Tabela 1 Características físico-químicas de três derivados de NaSAs (NaSD, NaSMR, NaSMT) [27].

NaSA	NaSD	NaSMR	NaSMT
Massa molar / (g mol^{-1})	272,3	286,3	300,3
Solubilidade aquosa a 25 °C	1 parte em 2 partes de água	1 parte em 3,6 partes de água	1 parte em 2,5 partes de água

A utilização de antibióticos na forma de sais é bastante extensa, apresentando várias vantagens sobre as formas moleculares associadas. São entidades químicas seguras, possuem alta solubilidade aquosa, higroscopicidade reduzida, permitem corrigir propriedades organolépticas, podem cristalizar mais facilmente e, geralmente, são as formas mais estáveis de substâncias ativas [28].

Em 2019, a OMS lançou a lista dos antibióticos classificados como “grupo de acesso”, cujo uso é recomendado por exibirem atividade contra uma ampla gama de agentes patogênicos comumente encontrados, apresentando ao mesmo tempo um menor potencial de resistência do que os antibióticos nos outros grupos. Os antibióticos com o prefixo sulfa estão presentes nessa lista [29].

O modo de atuação desta classe de antibióticos consiste no bloqueamento de enzimas através da competição com certos produtos que a bactéria é incapaz de sintetizar. As SAs são derivadas da *p*-aminobenzenossulfonamida, que é um análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzoico, um componente necessário nas bactérias para a síntese do ácido fólico, precursor da purina, dos ácidos nucleicos e, principalmente, do DNA. Enquanto a maioria das bactérias não é capaz de utilizar o ácido fólico de origem exógena e tem de o sintetizar para cumprir as suas funções vitais, nas células animais não é possível sintetizá-lo e ele deve ser obtido através do consumo de alimentos. As SAs, cujas estruturas são semelhantes à do ácido *p*-aminobenzoico, substituem-no e interferem na biossíntese do ácido fólico. Como resultado, a enzima diidropteroato sintetase constrói uma molécula “falsa” de ácido fólico, que não é capaz de realizar a função vital do verdadeiro ácido fólico. Assim, a atividade antibacteriana das SAs consiste na inibição do crescimento bacteriano ao interferir na síntese microbiana do ácido fólico [30].

A aplicação destes antibióticos tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e centra-se na medicina veterinária, onde são utilizados para tratar doenças do gado, como infecções gastrointestinais e do trato respiratório. A NaSD e NaSMR são eficazes para infecções causadas por estreptococos, gonococos, pneumococos, estafilococos, bem como bacilos do cólon. A NaSD é ainda usada para pneumonia, meningite cerebral, seps e estafilocócica e estreptocócica e outras doenças infecciosas. Já a NaSMT é utilizada para tratar infecções pneumocócicas, estafilocócicas e estreptocócicas, bem como para seps e gonorreia e outras doenças infecciosas [31].

As taxas de excreção das NaSAs (85–90%) são extremamente altas [32], razão pela qual constituem uma das classes de antibióticos mais utilizados e com grandes quantidades de resíduos detetados em água [33]. As NaSAs são prontamente biodegradáveis, pelo que têm um elevado potencial para causar efeitos colaterais desfavoráveis [34]. Embora a baixa concentração de antibióticos sulfa no ambiente não provoque toxicidade aguda óbvia para animais e plantas aquáticas, o seu efeito cumulativo pode causar genotoxicidade e alterações

histopatológicas negativas em organismos aquáticos, representando também uma potencial ameaça à saúde humana [31,32].

Embora as NaSAs pertençam à lista de antibióticos do “grupo de acesso”, o seu uso descomedido poderá provocar o surgimento de bactérias resistentes à sua ação, que se podem desenvolver como resultado de mutações expressas na superprodução de ácido *p*-aminobenzóico, em alterações na própria diidropteroato sintetase ou na difusão reduzida das moléculas através das membranas celulares das bactérias [28,29].

1.3. Remediação Ambiental: do Problema à Solução

1.3.1. Sistema Legislativo

Os recursos hídricos, superficiais e subterrâneos, constituem um recurso finito essencial para a agricultura, indústria e existência do Homem. Sem água doce em quantidade e qualidade adequadas não é possível assegurar um desenvolvimento sustentado, pelo que é fundamental apostar na sua proteção. Nessa perspetiva, a Diretiva-Quadro da Água [35], uma legislação da União Europeia adotada em 2000, estabelece os princípios e medidas para a gestão integrada e sustentável das águas para alcançar o seu bom estado até 2027. Alguns dos principais objetivos incluem:

- 1) Prevenir a degradação das águas e proteger o seu estado químico e ecológico;
- 2) Promover o uso sustentável dos recursos hídricos, levando em consideração as necessidades dos diferentes setores;
- 3) Garantir a participação do público na tomada de decisões relacionadas à água;
- 4) Promover a cooperação entre os Estados membros da União Europeia em questões relacionadas à água.

1.3.2. Tratamento de Efluentes

A qualidade da água só pode ser determinada de forma adequada após uma caracterização completa da sua composição química, biológica e física. As restrições dos níveis máximos de um componente específico na água não são determinadas apenas pelo seu uso, mas também levam em consideração as exigências do processo ao qual a água será submetida [36].

A verificação da presença de resíduos de antibióticos em diferentes tipos de águas e solos coloca em causa a eficácia do seu tratamento nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) [37]. Essas questões são críticas para a saúde humana e dos animais, por causa dos níveis de toxicidade e permanência na água, pois as baixas concentrações de antibióticos que permanecem em circulação atingem as águas subterrâneas potáveis, e, embora a aplicação de abordagens de descontaminação remova grande parte dos contaminantes, os métodos não removem concentrações muito baixas destes resíduos [38]. As ETARs são projetadas e construídas para a remoção de matéria orgânica e alguns nutrientes. Portanto, a capacidade de remover antibióticos é limitada [39].

A remoção dos contaminantes nas águas é o resultado de diferentes processos, tanto abióticos (coagulação, filtração por membrana, adsorção, hidrólise, fotólise e métodos avançados de oxidação) quanto bióticos (biodegradação por bactérias e fungos) [40]. Os processos promovidos em ETARs estão ilustrados na figura 3 e serão descritos de seguida. Primeiramente, as águas residuais são conduzidas para as ETARs por meio de tubulações e são submetidas a um tratamento preliminar, onde os sólidos de maiores dimensões são removidos por uma grade. Em seguida, passam por um tratamento primário para remover areia, óleos e gordura. No tratamento secundário retiram-se as pequenas partículas sólidas ainda existentes por decantação e filtração, que ficam no fundo do tanque, enquanto a parte líquida flui na superfície. Também é realizado um tratamento terciário, onde as impurezas que resistam aos tratamentos anteriores, como bactérias, tentam decompor-se através de micro-organismos adsorvidos a materiais como o carvão ativado [41]. Outros métodos também utilizados para remover substâncias ativas incluem a cloração, ozonização e processos de oxidação avançados (AOPs) [42]. Por fim, ocorre a transformação em lodo, que se acumula no fundo dos tanques, permitindo outra decantação, enquanto a água resultante é desinfetada com radiação ultravioleta para eliminar micróbios remanescentes. No entanto, as técnicas tradicionais de tratamento biológico ainda apresentam desvantagens, visto que se continuam a desenvolver bactérias multiresistentes [43].

Embora vários antibióticos possam ser biodegradados naturalmente, os antibióticos sintéticos são mais resistentes à degradação no ambiente natural devido à sua estabilidade estrutural, o que dificulta a sua oxidação por processos convencionais de tratamento [44]. Surge assim a necessidade de otimizar esses processos através da implementação de novas tecnologias promissoras assentes tentativa de captar estes resíduos do meio aquático.

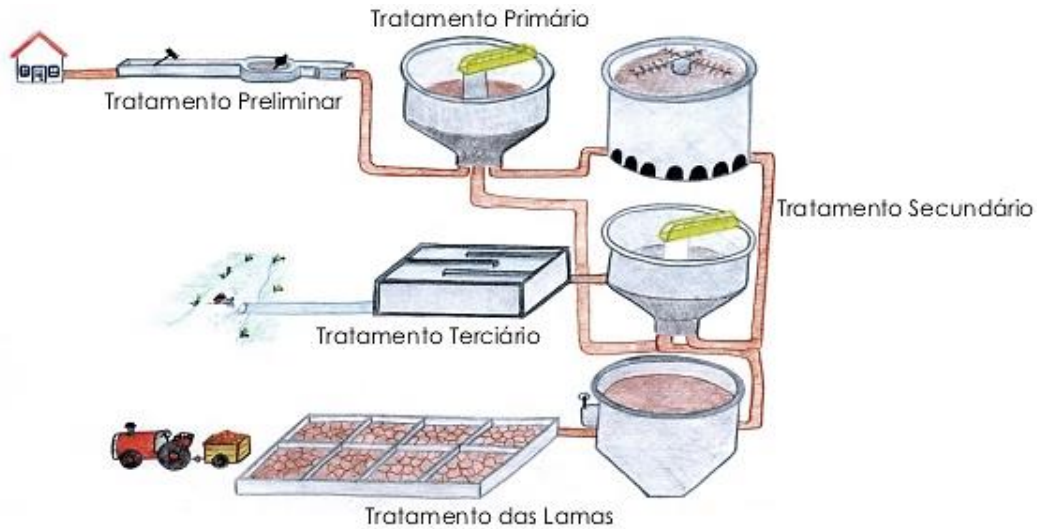


Figura 3 Esquema dos processos realizados em ETARs. Adaptado de [45].

1.3.3. Processos de Sorção

Os processos de sorção incluem todos os processos físicos e químicos através dos quais átomos ou moléculas na fase fluída interagem com a superfície de uma substância sólida, nas regiões interfaciais [46]. Esses processos possibilitam a caracterização de materiais sólidos e englobam diferentes mecanismos pelos quais as partículas dissolvidas (adsorvato) entram na matriz de um material sólido (adsorvente), incluindo adsorção, absorção, incorporação de microporos e formação de agregados. [47,48].

A absorção envolve a penetração das partículas na matriz polimérica, ocupando espaços intersticiais. Nesse processo, as partículas podem interagir com os segmentos poliméricos por meio de forças intermoleculares, como ligações de hidrogénio, interações dipolo-dipolo ou interações de *van der Waals* [47].

A incorporação em microporos refere-se à entrada das moléculas de adsorvato em poros ou cavidades microscópicas presentes na matriz polimérica. Esses microporos podem ser estruturas internas do polímero ou resultar de processos de fabricação, como a formação de espumas ou materiais porosos [48].

A formação de agregados é um processo no qual as moléculas do adsorvato se agrupam e se organizam dentro da matriz polimérica, formando estruturas maiores ou complexas. Esses agregados podem ser resultado de interações específicas entre as moléculas de adsorvato ou de propriedades intrínsecas do polímero [48].

A adsorção consiste no aumento da concentração do adsorvato na superfície do adsorvente, através da ação de forças superficiais, nomeadamente interações físicas (fisissorção), estabelecimento de forças intermoleculares atrativas de dispersão e de *Van der Waals*, ou químicas (quimissorção), formação de ligações químicas entre o adsorvato e a superfície do adsorvente [49]. Os fenómenos de adsorção são comumente reversíveis e podem ser definidos através de um conjunto de equações de equilíbrio que estabelecem uma relação entre a quantidade de adsorvente e as quantidades de adsorvato adsorvidas e em solução. O estudo deste processo dinâmico permite obter informações detalhadas sobre as propriedades dos materiais, como capacidades de adsorção, propriedades de superfície e afinidades específicas para determinados adsorvatos [50].

A técnica de adsorção é um dos métodos mais utilizados no tratamento de efluentes, já que possibilita altas eficiências de remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos e tem potencial para tratar grandes quantidades de água para diversos fins [51]. A capacidade de adsorção é inteiramente dependente de fatores como a área superficial disponível para atrair as partículas em causa, tempo de contato, concentração, modelos isotérmicos, cinética e condições de reação. As estruturas porosas dos adsorventes também ajudam na remoção de poluentes das águas residuais [52].

A incorporação do carvão ativado nos processos de tratamento de águas apresenta desafios a nível económico, ambiental e de saúde pública que devem ser considerados, nomeadamente o elevado custo de produção, a eliminação de resíduos tóxicos sob a forma de gases e resíduos sólidos, que podem contaminar a água e o solo, a dificuldade de reciclagem, redução da eficiência ao longo do tempo e problemas com a libertação de substâncias tóxicas, como metais pesados ou compostos voláteis na água tratada [53,54]. Estes problemas fomentam a procura de materiais que reúnam capacidades de adsorção semelhantes ou aprimoradas e, em simultâneo, combatam as desvantagens apresentadas. Tem surgido um interesse crescente em polímeros de origem natural como alternativa aos adsorventes convencionais para remediação ambiental, como sílica gel, zeólitos, oligo- e polissacarídeos [55], com base na sua alta disponibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e alta funcionalidade química, permitindo que sejam sintetizados adsorventes sustentáveis, verdes e, se desejado, seletivos [56].

1.4. Química Supramolecular

A química supramolecular foi definida por Jean–Marie Lehn [57] como a química para além da molécula. É um campo interdisciplinar da ciência que envolve as características químicas, físicas e biológicas de conjuntos moleculares com uma complexidade maior do que as próprias moléculas individuais. Enquanto a química tradicional se baseia em ligações covalentes (com energias de ligação de até 400 kJ mol^{-1}), a química supramolecular envolve um tipo de ligação não covalente, como interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, ligações de hidrogénio (aproximadamente 40 kJ mol^{-1}) e interações de *Van der Waals* (aproximadamente 4 kJ mol^{-1}) [58]. Estas forças são caracterizadas por serem bastante fracas, pelo que é necessário ser estabelecido um elevado número de interações e um arranjo espacial adequado para que a associação entre duas moléculas seja efetiva [59], visto que a constante de associação deste tipo de sistemas é pouco extensa. A ocorrência do elevado número de interações num mesmo sistema pode originar alterações nas propriedades dos constituintes dessa mesma associação molecular [60].

A química supramolecular pode ser classificada em duas categorias principais, esquematizadas na figura 4: reconhecimento molecular e automontagem molecular.

O reconhecimento molecular é geralmente associado à interação que ocorre na cavidade ou orifício de uma molécula, considerada a molécula hóspede (*host*), por parte de outra molécula, a molécula hospedeira (*guest*), formando um complexo supramolecular hospedeiro–hóspede (*host–guest*). Segundo Cram [61], o hospedeiro é uma molécula ou ião cujos locais de ligação convergem no complexo, enquanto o hóspede é uma molécula ou ião cujos locais de ligação divergem no complexo, apresentando assim menores dimensões. A complementaridade entre o tamanho do hóspede e o tamanho do hospedeiro é crítica para um comportamento de ligação eficiente.

A montagem molecular é um processo em que as moléculas individuais se organizam de forma controlada para originar agregados supramoleculares bem organizados. Estes agregados são estruturas maiores e mais complexas utilizadas frequentemente para construir materiais funcionais com propriedades específicas, como materiais nanotecnológicos e sensores moleculares [62].

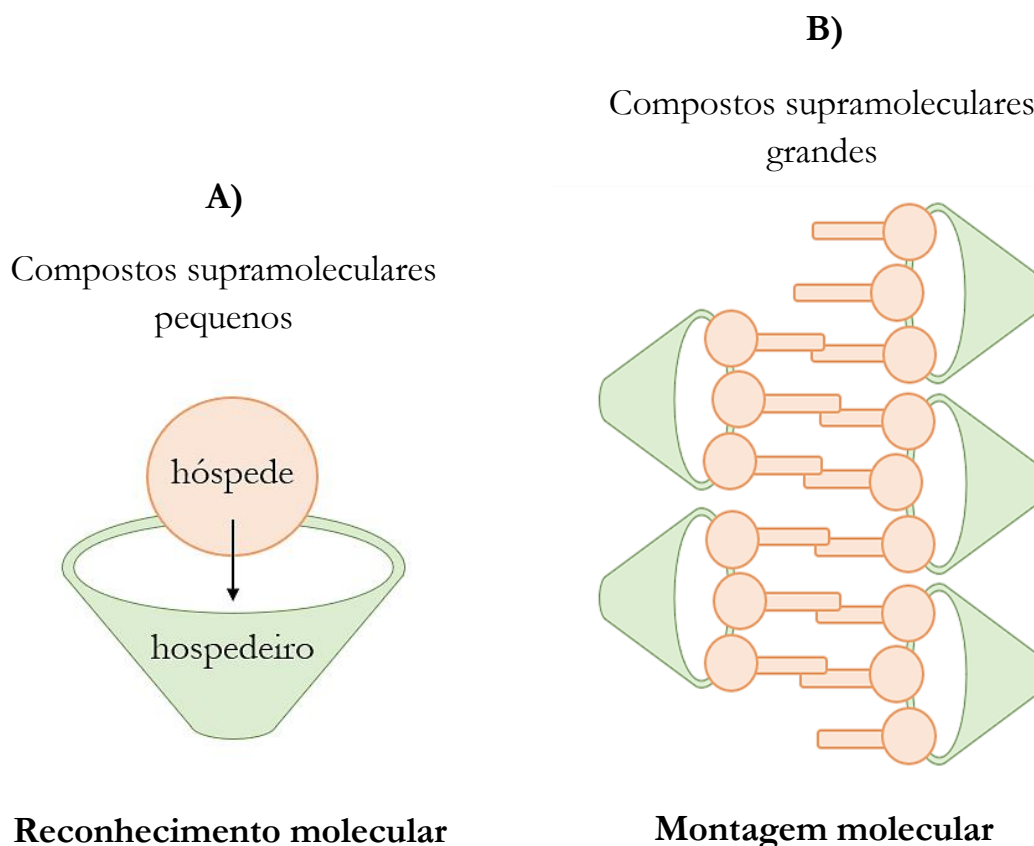


Figura 4 *Categorias principais da química supramolecular: A) reconhecimento molecular; B) montagem molecular.*

Relativamente aos hospedeiros, tem sido realizada pesquisa focada no desenho e síntese de recetores macrocíclicos com propriedades e funções específicas, com especial interesse na sua afinidade e seletividade para moléculas relevantes. Existe uma grande variedade de macrocilos, naturais e artificiais, com diferentes tamanhos, densidade de carga, flexibilidade e grupos funcionais, que possuem capacidade de reconhecimento molecular e, por vezes, montagem molecular. Na figura 5 estão expostas algumas das moléculas hospedeiras mais comuns documentadas na literatura [63].

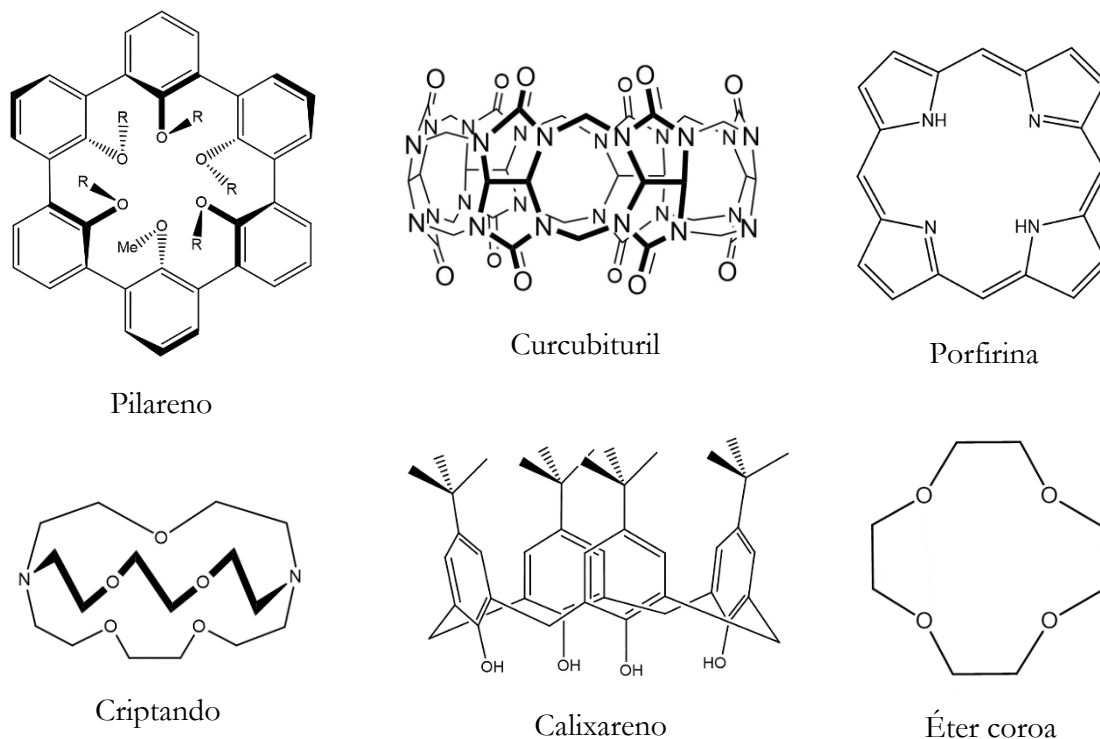


Figura 5 Estrutura molecular de algumas das moléculas hospedeiras mais comuns documentadas na literatura.

1.4.1. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) foram isoladas pela primeira vez em 1891, por Villiers [64], em trabalhos realizados sobre a ação de enzimas em hidratos de carbono. Ao estudar a ação de *Bacillus amylobacter* no amido da batata detetou a formação de cristais indesejados com propriedades particulares, resultantes da degradação bacteriana do amido através da hidrólise de ligações glicosídicas. Villiers designou-os de *cellulosine*, devido às semelhanças com a celulose, e ainda constatou a existência de duas estruturas cristalinas distintas de CDs. Mais tarde, Schardinger [65] conseguiu distinguir as duas formas cristalinas através da adição de uma solução de iodo que formava cores distintas em contato com as diferentes CDs. Entre 1904 e 1911, estudou detalhadamente os dois cristais, desde o seu isolamento e purificação até à sua composição e, nos anos seguintes, o estudo das CDs foi crescente, mas pouco relevante, devido à carência de estudos incidentes na toxicidade [66]. Em 1953, Freudenberg, Cramer e Plieninger [67] registaram uma patente na qual cobriam quase todos os aspetos fundamentais da utilização de CDs na formulação e libertação de fármacos. Eventualmente, novas pesquisas científicas refutaram a hipótese das CDs possuírem toxicidade e esta causa foi atribuída às impurezas e à dosagem incorreta das mesmas. Por esse motivo, no início de 1970, o interesse pelas CDs foi notório e levou a um acréscimo exponencial do número de

publicações. Atualmente, o seu custo de produção diminuiu, o que tem permitido a aplicação a nível industrial [68].

As estruturas das CDs nativas mais comuns, representadas na figura 6, consistem num conjunto de 6, 7 ou 8 unidades glucosídicas unidas por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosilo, designando-se, respetivamente, por α -CD, β -CD e γ -CD [69]. Na tabela 2 estão sumariadas algumas propriedades físico-químicas destas CDs [70]. Existem CDs com maiores dimensões que não são estruturas cilíndricas regulares, como a δ -CD, que apresenta 9 unidades glicosídicas na sua estrutura, mas elas estão colapsadas e a sua cavidade real é ainda menor que a da γ -CD.

As unidades cíclicas das CDs encontram-se na conformação em cadeira, o que permite minimizar repulsões entre grupos substituintes e, conseqüentemente, conferir uma estrutura em forma de cone truncado com dois ambientes distintos; uma cavidade hidrofóbica, devido aos pares de eletrões não-ligantes das ligações glicosídicas que se encontram direcionados para o interior da cavidade e que geram uma alta densidade de eletrões, assim como as ligações C-H das cadeiras hidrocarbonadas do anel que se encontram voltadas para a região interior, e uma superfície externa hidrofílica, como consequência dos grupos hidroxilo posicionados em ambas as extremidades da cavidade [71]. Esta característica estrutural atribui-lhes um carácter anfifílico que possibilita interações com diferentes moléculas de interesse: a cavidade hidrofóbica permite formar estruturas supramoleculares do tipo hospedeiro-hóspede através de interações não covalentes e a superfície externa hidrofílica permite a interação com compostos polares, possibilitando a dissolução em sistemas aquosos. A sua solubilidade em água resulta da capacidade de interação dos grupos hidroxilo livres com o meio aquoso [72].

Adicionalmente a este “microambiente” único, as CDs apresentam elevada reatividade como consequência dos grupos hidroxilo poderem ser protonados ou tosilados, e participarem facilmente em reações de substituição ou eliminação, o que facilita a ocorrência de reações de copolimerização diretamente com monómeros selecionados para formar estruturas reticuladas ou a inserção de materiais orgânicos ou inorgânicos [73]. Esta característica também permite a sua funcionalização, sendo já relatados mais de 11.000 derivados de CDs na literatura [74].

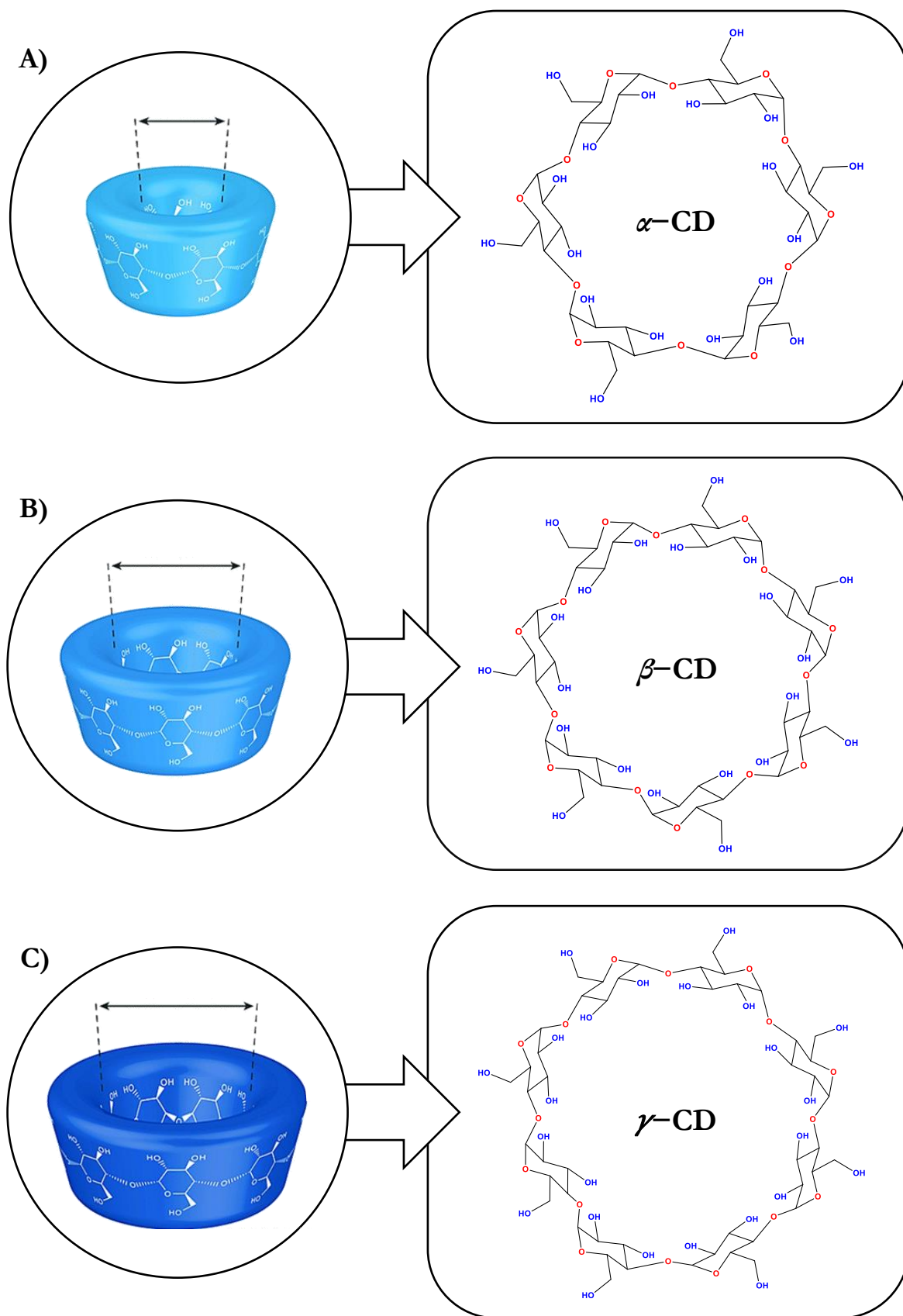


Figura 6 Estrutura molecular de **A)** α -CD, **B)** β -CD e **C)** γ -CD.

Tabela 2 Propriedades físico-químicas da α -CD, β -CD e γ -CD [62].

CD	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Massa molar / (g mol ⁻¹)	972,9	1135,0	1297,2
Diâmetro interno da cavidade / (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volume da cavidade / (Å ³)	174	262	427
Solubilidade aquosa a 25 °C / (% m/v)	14,5	1,85	23,2
Água de cristalização / (% m/m)	10,2	13 – 15	8 – 18

A forma da β -CD apresenta vantagens na formação de complexos de inclusão devido ao tamanho da sua cavidade, que confere uma maior estabilidade, capacidade de complexação e maior número de sítios de encapsulamento, além de possuir um baixo custo aliado à sua rápida produção [75]. Este facto comprova-se pelo maior número de analitos com os quais a β -CD interage, comparativamente à α -CD e γ -CD, estando presente na maioria das formulações existentes no mercado [76]. A capacidade da α -CD para formar complexos de inclusão encontra-se reduzida devido ao pequeno volume da sua cavidade, enquanto a cavidade da γ -CD geralmente possibilita a formação de vários complexos de inclusão [70].

A grande desvantagem da β -CD é a baixa solubilidade em água, quando comparada com as restantes. A sua solubilidade reduzida deve-se às ligações, relativamente fortes, que se estabelecem entre moléculas de β -CD no estado cristalino, assim como a presença de ligações intramoleculares entre o grupo hidroxilo situado na posição C₂ e o grupo hidroxilo da posição C₃, nas sete unidades glicosídicas, que resultam na redução do número de grupos hidroxilo disponíveis para estabelecer ligações de hidrogénio com as moléculas de água circundantes [60]. A α -CD apresenta uma solubilidade maior do que a β -CD, pois, apesar

de apresentar menos grupos hidroxilo na estrutura global, eles encontram-se mais disponíveis para efetuar ligações de hidrogénio com o meio aquoso, visto que uma das unidades de glucopirranose na sua estrutura se encontra numa posição distorcida e, em vez das seis possíveis ligações de hidrogénio, apenas quatro podem ser estabelecidas completamente. A γ -CD apresenta uma estrutura não coplanar, mais flexível, onde os grupos hidroxilo de encontram mais disponíveis para formar ligações de hidrogénio com a água, sendo por isso o macrociclo com maior solubilidade aquosa dentro deste conjunto [70].

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários derivados das CDs no sentido de alargar as propriedades físico-químicas e capacidades de complexação. Na sua grande maioria, as CDs modificadas resultam de β -CDs naturais. Através da introdução de grupos funcionais ao nível dos grupos hidroxilo das CDs é possível alterar a sua capacidade de complexação, assim como aumentar consideravelmente a sua solubilidade. A derivatização química pode transformar as CDs cristalinas em estruturas amorfas, como é o caso da HP- β -CDs. Elas são utilizadas para inibir o polimorfismo e a velocidade de cristalização de fármacos pouco hidrossolúveis durante o seu armazenamento, mantendo as suas características de dissolução e biodisponibilidade oral ao mesmo tempo que aumenta a sua solubilidade [62,69].

Todos os fatores supramencionados fundamentam a capacidade que as CDs apresentam para interagir com uma elevada quantidade de compostos, nomeadamente antibióticos, surfactantes, poluentes orgânicos, corantes, iões metálicos, entre outros [77], tornando a sua aplicação a nível industrial bastante abrangente [68]. Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido usadas em medicamentos, seja para complexação ou como aditivos auxiliares, solubilizantes, diluentes ou como ingredientes de comprimidos, para melhorar as propriedades físicas e químicas ou para aumentar a biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis. Na indústria química, as CDs e os seus derivados são usados como catalisadores para melhorar a seletividade das reações, bem como para a separação e purificação de produtos em escala industrial. Nas indústrias de alimentos, cosméticos e produtos de higiene, as CDs têm sido amplamente utilizadas para a estabilização de sabores e fragrâncias ou para a eliminação de sabores indesejados, contaminações microbiológicas e outros compostos indesejados [74].

1.4.2. Processos de Inclusão Molecular

As moléculas de água no interior da cavidade dos hospedeiros estão numa situação energética desfavorável e possuem uma alta entalpia que incapacita a formação de ligações de hidrogénio ou outro tipo de interação não covalente com o meio aquoso circundante. Adicionalmente, existem interações polar–apolar energeticamente desfavoráveis entre a água incluída na cavidade e a CD e entre a água do meio e o hóspede. As forças responsáveis pela formação destes complexos incluem a substituição dessas interações por interações apolar–apolar (entre o hóspede e a cavidade) e polar–polar (entre a água do meio circundante e as moléculas de água libertadas da cavidade) que são preferenciais. Portanto, o processo global da formação de complexos de inclusão é energeticamente favorecido em termos de entalpia e entropia, resultando na diminuição da energia total do sistema [74].

O aumento do diâmetro da cavidade apolar do hospedeiro permite a acomodação de um número crescente de moléculas de água “complexadas” e elas irão diferir energeticamente cada vez menos do volume de água no meio aquoso circundante. Como consequência, a formação de complexos em macrociclos maiores não resulta num ganho significativo de energia e a força motriz da formação do complexo é mais fraca [78].

Nem todas as moléculas apresentam características adequadas para serem complexadas. A compatibilidade geométrica de complexos de inclusão depende de fatores como a estrutura, tamanho, carga e polaridade das moléculas intervenientes, assim como do efeito do meio de reação (solvente) e da temperatura. Apenas moléculas apolares (ou grupos funcionais da molécula), cujas dimensões sejam inferiores à cavidade do macrociclo, podem ser incluídas nessa cavidade [62,69].

A estabilidade do complexo aumenta com o aumento do caráter doador de elétrons dos substituintes da molécula incluída e o papel da ligação de hidrogénio não é universal, porque são formados complexos estáveis com compostos que não podem formar ligações de hidrogénio, como por exemplo o benzeno.

A interação nos complexos *host–guest* é possível com toda a molécula de hóspede ou apenas com parte dela e a afinidade pode ser medida quantitativamente através de uma constante de associação, K [56,62]. Estes complexos podem apresentar diferentes estequiometrias, sendo as mais relatadas 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1 e 2 : 2 (hospedeiro : hóspede). O equilíbrio dinâmico desta interação pode ser descrito pela equação **(1.1)**.



onde H é a molécula *host*, G é a molécula *guest*, x é o número de moléculas de H, y é o número de moléculas de G. A associação e dissociação são processos dinâmicos que ocorrem muito rapidamente num espaço de tempo da ordem dos milissegundos, mesmo para complexos com constantes de estabilidade mais elevadas [79].

1.4.3. Técnicas Utilizadas no Reconhecimento de Processos de Inclusão Molecular

Os complexos de inclusão podem ser formados no estado cristalino ou em solução, existindo técnicas distintas, e de certa forma complementares, para o reconhecimento destes processos de inclusão molecular, que permitem obter informações sobre a constante de ligação, a estequiometria do sistema hospedeiro-hóspede e a localização da ligação entre o hospedeiro e o hóspede dentro de suas estruturas relativas [74].

No estado cristalino, os complexos de inclusão referem-se à formação de estruturas cristalinas em que as moléculas hóspedes são incluídas dentro da rede cristalina tridimensional das moléculas hospedeiras, ocupando posições específicas em sítios de inclusão. Estes tendem a ser mais estáveis e rígidos devido às interações bem definidas com ordem de longo alcance. A monitorização de complexos de inclusão no estado cristalino é efetuada através de técnicas como microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X em pó (PXRD), espectroscopia Raman, técnicas analíticas térmicas, incluindo análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varrimento (DSC) [80].

Em solução, as moléculas hóspedes estão dispersas num solvente e os complexos de inclusão em solução tendem a ser mais flexíveis, uma vez que as moléculas hóspedes não estão fixadas na rede cristalina das moléculas hospedeiras. Deste modo, o estabelecimento de interações intermoleculares desempenha um papel fundamental na estabilização do complexo de inclusão em solução. Os complexos de inclusão em solução podem ser caracterizados por técnicas como espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis), espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), calorimetria de titulação isotérmica (ITC), dicroísmo circular e condutimetria [81].

Além das técnicas mencionadas, podem ser aplicados métodos computacionais para fazer previsões e avaliar a capacidade de formação de um determinado complexo de inclusão entre duas moléculas de interesse [82].

1.4.4. Materiais Adsorventes à Base de Ciclodextrinas

Embora as CDs sejam solúveis em água e, portanto, inutilizáveis como adsorventes em meio aquoso, elas podem ser funcionalizadas. A formação de materiais adsorventes à base de CDs pode ocorrer através de várias formas distintas, como as que estão representadas na figura 7, nomeadamente: reticulação, que diz respeito a reações para obter estruturas moleculares estáveis, permitindo a ligação entre moléculas; imobilização, que envolve imobilizar a CD no suporte sólido por métodos físicos ou químicos; automontagem, referente ao procedimento de transição de um sistema de um estado desorganizado para um estado bem estruturado enquanto os componentes interagem.

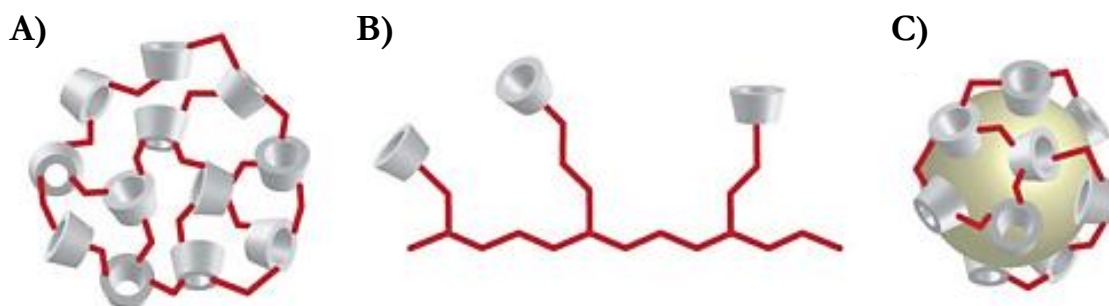


Figura 7 Diferentes abordagens desenvolvidas para preparar materiais à base de CD funcionalizadas: **A)** polímeros de CDs; **B)** imobilização de CDs em matrizes insolúveis; **C)** automontagem de CD em matrizes insolúveis [83].

Os principais progressos no desenvolvimento de materiais baseados em CDs incluem polímeros, como nanoesponjas e hidrogéis, e nanocompósitos, utilizados como materiais adsorventes com alta afinidade para contaminantes em águas residuais. Todos estes adsorventes apresentaram boa estabilidade, recuperações satisfatórias e baixos limites de deteção. Os mecanismos de adsorção não são dependentes da natureza do ligante, sendo que as moléculas CD desempenham o papel mais importante no mecanismo, o qual envolve vários tipos de interações: adsorção física na rede polimérica, ligação de hidrogénio e formação de um complexo de inclusão devido às moléculas de CD através da interação hospedeiro–hóspede [83].

A caracterização destes materiais adsorventes é um fator imperativo para avaliar o seu potencial, nomeadamente a determinação do teor do complexo de inclusão, adsorção de água, ponto de carga zero e temperatura de decomposição. O grau de reticulação pode ser determinado a partir de FTIR. Também podem ser determinadas as condições ótimas de adsorção, ou seja, concentração inicial de impurezas e adsorventes, tempo de contato, pH e presença de sais. Além disso, as amostras de material podem ser submetidas a outros testes necessários para a caracterização completa do material, como SEM, análise elementar, análise de área superficial (BET) e TGA. A regeneração de um adsorvente também desempenha um papel crucial na determinação da sua eficiência e uso mais prolongado. É possível preparar inúmeros materiais adsorventes, mas devido à falta de propriedades de regeneração, a maioria deixa de ser útil para este tipo de aplicações. A eficiência da regeneração depende da solubilidade do poluente no solvente aplicado na regeneração. Contudo, para materiais adsorventes funcionalizados por CDs tem sido relatado que estes perdem a sua capacidade de adsorver após cada ciclo, sendo esse um fator determinante para a sua reutilização [77].

1.4.5. Nanoesponjas

Nas últimas décadas, as CDs têm sido utilizadas para sintetizar um novo material supramolecular com capacidade de adsorção aperfeiçoada, as nanoesponjas (NSs), respondendo à necessidade de superar as limitações das CDs nativas [84]. Consistem em estruturas 3D hiper-reticuladas nanoporosas (diâmetro menor a 2 nm), de natureza hidrofílica e insolúveis em água, com a estrutura generalizada representada na figura 8. Possuem elevada estabilidade térmica (geralmente até 300 °C) e em meios com diferentes pH e/ou solventes orgânicos. Os diferentes reticulantes e o grau de reticulação permitem a construção de estruturas poliméricas de polaridade e dimensão distintas, podendo levar à formação de NSs de CDs com propriedades únicas e tirando partido da sua natureza biodegradável, não tóxica e biocompatível. Mostram uma elevada capacidade para conferir modificações benéficas das propriedades de moléculas hóspedes lábeis através do seu encapsulamento, aumentando a estabilidade de compostos sensíveis e voláteis, melhorando a solubilidade de analitos lipofílicos e propriedades como a citotoxicidade, biodisponibilidade, entrega de fármacos, proteção e transporte de moléculas instáveis [85].

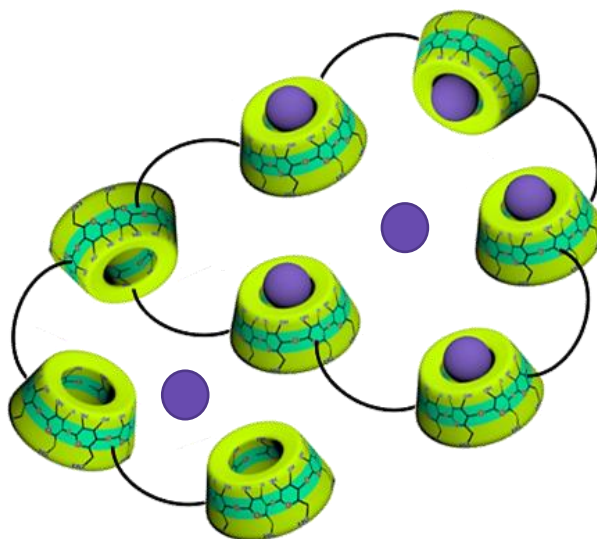


Figura 8 Representação esquemática de NSs de CDs. ● Zona hidrofílica externa; ● Zona hidrofóbica interna; ● Analito; ● Material reticulante genérico. Adaptado de [86].

A interação com um analito é determinada por fatores como a dimensão das nanoesponjas, área de superfície, rede porosa, carga e potencial ζ . Essas propriedades são muito afetadas pela estrutura das NSs, que depende da forma da CD escolhida, quantidade e tipo de reticulante, proporção de CD : reticulante e do solvente, catalisador e condições sintéticas usadas. Normalmente, o aumento da proporção do reticulante em relação à CD resulta numa diminuição do diâmetro dos poros, mas também numa maior área superficial, o que pode criar uma conexão polimérica interna superior e formar um material com uma maior porosidade. Os agentes de reticulação podem ser variados, originando NSs do tipo carbonato (usando compostos carbonílicos), carbamato (reticulados com diisocianatos), éster (utilizando dianidridos e ácidos carboxílicos), éter (com epóxidos), poliamida e poliamina, entre outros, desde que os reticulantes apresentem dois grupos terminais reativos para possibilitar a reticulação entre CDs [86].

As NSs de CDs podem ser agrupadas em quatro gerações consecutivas, de acordo com as suas propriedades. A 1ª geração englobe as NSs sintetizadas pela reação simples de CDs com os reticulantes anteriormente mencionados. Esta classe de materiais tem sido utilizada para preparar os precursores das NSs das seguintes classes, as quais constituem estruturas poliméricas mais complexas. Na 2ª geração existem polímeros com propriedades específicas, como por exemplo, fluorescência ou cadeias laterais carregadas que conduzem a corrente elétrica. A 3ª geração contém NSs responsivas a estímulos, modificando o seu comportamento de acordo com mudanças no ambiente, como gradientes de pH,

temperatura e condições redutoras/oxidativas. Por fim, a 4^a geração inclui polímeros molecularmente impressos com alta seletividade para moléculas hóspede específicas [87].

1.5. Objetivos da Tese

Neste projeto científico pretendeu-se compilar todos os conteúdos supracitados de forma a efetuar uma contribuição para o mapeamento de soluções no que diz respeito à remoção de antibióticos dos efluentes através de estruturas supramoleculares, visando possíveis aplicações em ETARs. Procedeu-se à avaliação da interação entre três macrociclos selecionados (α -, β - e γ -CD) e três antibióticos de NaSAs (NaSD, NaSMR e NaSMT). Para isso, utilizaram-se técnicas como difusão isotérmica em líquidos (método de dispersão de Taylor), UV-vis, RMN e ITC para obter informações sobre a interação em meio aquoso, geometria estrutural da interação, estequiometria e parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação. Por fim, considerando os resultados obtidos nestes estudos, foram sintetizadas NSs de β -CD (CD- α -CD, CD- α -GLT- α -CD e CD- α -GLT- α -CD), caracterizadas através de ¹H-RMN, FITR-ATR e TGA e foi testada a sua capacidade de adsorção em soluções aquosas dos antibióticos mencionados.

Capítulo 2

2. Difusão Isotérmica

A determinação de propriedades físico-químicas em solução aquosa é essencial para compreender as diferentes interações estabelecidas entre espécies neste meio. No contexto do desenvolvimento de materiais adsorventes para a remoção de antibióticos de efluentes, o estudo de propriedades como a difusão desempenha um papel fundamental que deve ser considerado. Este fenómeno está presente em processos que envolvem a transferência de massa, como reações químicas e processos biológicos [88].

Na difusão isotérmica não há variação de temperatura, o que impede qualquer variação na energia cinética média das partículas envolvidas no processo de difusão e, conseqüentemente, na sua velocidade, garantindo que a velocidade de difusão não é afetada pela temperatura [89].

O processo de difusão intermolecular em líquidos ocorre em solução quando existe uma diferença de concentração entre zonas próximas no espaço, originando-se um fluxo espontâneo de matéria de forma a reduzir essa diferença e reestabelecer o equilíbrio do sistema [90]. Na verdade, a força impulsionadora da difusão é o gradiente de potencial químico da substância difundente, mas em soluções ideais é igual ao gradiente de concentração a temperatura constante. Esta aproximação é possível para sistemas diluídos, onde as interações entre as moléculas são geralmente consideradas fracas e as soluções aproximam-se do comportamento ideal. Sob essas condições, o coeficiente de atividade tende a aproximar-se de 1, indicando que a sua variação é insignificante em relação à diferença de concentração responsável pela difusão [91].

Este gradiente de concentração, livre do efeito de correntes de convecção, é o resultado de movimentos permanentes nas partículas em solução, conhecidos como movimentos brownianos, onde cada molécula de soluto se comporta de forma independente das restantes. Conseqüentemente, ocorrem colisões que irão provocar uma deflexão da trajetória das moléculas que colidem e a nova direção que assumem não será preferencial [92].

A difusão pode ser avaliada quantitativamente através do coeficiente de difusão de cada componente presente na solução, que relaciona a quantidade de fluxo da substância com o seu gradiente de concentração. Esta relação é descrita através das leis de Fick e da termodinâmica aplicada a processos irreversíveis e, através delas, é possível determinar experimentalmente os coeficientes de difusão de cada sistema [93]. Como a difusão em sistemas binários e multicomponentes é um fenómeno tridimensional, torna-se conveniente limitá-lo a uma só dimensão (eixo x, por exemplo) para simplificar o processo de medição e o tratamento matemático envolvido na determinação desta grandeza. Além disso, são criadas condições experimentais de forma a que o valor do coeficiente de difusão seja considerado constante, designando-se nessas circunstâncias por coeficiente de difusão diferencial.

A 1ª lei de Fick pode ser descrita pela equação (2.1).

$$-J_i = D_{ij} \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (2.1)$$

onde J_i corresponde à quantidade de matéria (em gramas, moles ou outra unidade) de um componente i , que atravessa um plano de unidade de área perpendicular ao eixo de difusão. Essa quantidade de matéria é proporcional ao seu gradiente de concentração na direção do eixo x, $\partial c_i / \partial x$, onde c_i representa a concentração do componente i . D_{ij} é o coeficiente de difusão do sistema, que representa o efeito do fluxo do componente j no comportamento do componente i . É introduzido o sinal negativo no valor de J_i para que o valor de D seja positivo, uma vez que a concentração diminui com o aumento de x e, portanto, o diferencial é negativo.

A variação da concentração em relação ao eixo x pode depender do tempo. Ao derivar a equação (2.1) é possível avaliar a variação da concentração com o tempo t, obtendo-se a equação (2.2), correspondente à 2ª lei de Fick.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ij} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

onde $\partial^2 c_i / \partial x^2$ é a segunda derivada do gradiente de concentração do componente i no eixo x.

Torna-se evidente que os coeficientes de difusão apresentam uma forte dependência da concentração do soluto, pelo que a maioria dos estudos procura utilizar situações em que se possa considerar diluição infinita [94].

Dos vários métodos experimentais utilizados para o estudo do processo de difusão [95,96], o método de dispersão de Taylor [97], método utilizado neste trabalho, torna-se vantajoso não só pela sua simplicidade e pela precisão dos resultados que dele advêm, como também apresenta a vantagem de permitir obter coeficientes de difusão diferenciais e não integrais com significado termodinâmico bem definido. Os estudos realizados por Taylor, e complementados por Aris [98], levaram a poucas aplicações, até Wakeham e colaboradores demonstrarem, a partir da análise das equações que descrevem esta dispersão, que esta técnica fornece resultados com precisão semelhante aos métodos tradicionais de estudo da difusão [99]. Desde então, este tipo de estudos tem suscitado cada vez mais interesse ao ponto de ser a técnica mais utilizada, no momento, para determinações de coeficientes de difusão em líquidos [100].

O princípio do método de dispersão de Taylor consiste em injetar uma pequena quantidade de soluto num fluido a escoar em fluxo laminar, constituído com os mesmos componentes que a solução injetada, mas com diferentes concentrações, por um tubo longo e estreito. Após a injeção, o soluto é disperso nas duas interfaces com o fluxo, estando representado na figura 9 o estado anterior e posterior relativo ao processo. A dispersão ocorre através da ação combinada de processos devidos à difusão molecular, causada pelo gradiente de concentração, e ao perfil parabólico de velocidades do eluente. O fluxo laminar distorce o pulso inicial de soluto, tendendo a aumentar a dispersão do pulso provocada apenas pela difusão molecular e, se esta for rápida o suficiente, as moléculas de soluto movimentam-se do interior do tubo para a região próxima às paredes e vice-versa, num movimento radial que diminui o efeito da dispersão axial. Adicionalmente, a velocidade de dispersão das moléculas junto às paredes do tubo será menor, devido ao atrito das paredes, comparativamente ao interior da solução. Deste modo, após um determinado intervalo de tempo, o perfil axial de concentração no interior do tubo assume uma forma quase gaussiana, sendo acompanhada no detetor, como um refratómetro diferencial, que fornece informações sobre o perfil médio de concentração radial em função do tempo [101]. Além disso, o fluxo do fluido permite que um único monitor da concentração fixado num ponto do espaço detete todo o soluto disperso, em vez das medições de concentração distribuídas espacialmente nos outros métodos [102].

O tratamento matemático do método é baseado na equação da 2ª lei de Fick e considera o coeficiente de difusão como uma constante. A sua resolução levará à obtenção de uma outra equação que relaciona a concentração média radial, \bar{C} , no fim do tubo de

difusão, com vários parâmetros, entre os quais a distância L do ponto de injeção e o tempo t de retenção do soluto. A distribuição da dispersão da solução injetada na saída do tubo pode ser seguida, fazendo passar o eluente através de um detetor, tal como um refratómetro diferencial, usado no presente estudo, o qual permite medir o perfil de concentração radial média como função do tempo. Assim, atendendo à resposta linear dada pelo detetor em função da variação da concentração, e considerando a equação que relaciona a \bar{C} , no fim do tubo de difusão à distância L do ponto de injeção, resultante do formalismo teórico e cujas linhas gerais foram acima citadas, obter-se-á a equação (2.3).

$$V(t) = V_0 + V_1 t + V_{\text{máx}} \left(\frac{t_R}{t}\right)^{1/2} \exp \left[\frac{-12 D (t-t_R)^{1/2}}{r^2 t} \right] \quad (2.3)$$

onde V_0 corresponde ao potencial da linha de base, V_1 ao declive da linha de base, $V_{\text{máx}}$ ao valor máximo de potencial no pico, t_R ao tempo médio de retenção e r ao raio interno do tubo de dispersão [103].

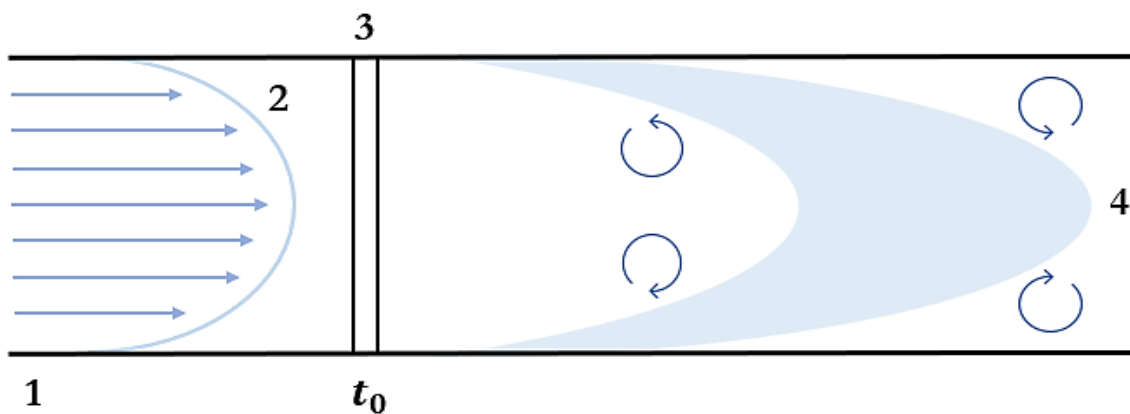


Figura 9 Perfil de difusão radial de um soluto num tubo de dispersão: **1)** tubo capilar; **2)** perfil de velocidade em fluxo laminar; **3)** injeção do soluto; **4)** difusão radial.

2.1. Difusão Isotérmica em Sistemas Binários

Os coeficientes de difusão mútua para sistemas binários (antibiótico ou macrociclo (componente 1) + água) podem ser descritos pela equação da 1ª lei de Fick da equação (2.1).

Os coeficientes de difusão dependem de fatores como a temperatura, pressão, viscosidade do solvente e presença de outras moléculas no meio [104], os quais se mantiveram constantes para todas as medidas dos coeficientes de difusão binários, pelo que é possível relacionar os seus valores com o tamanho e a forma das entidades estudadas.

Os resultados obtidos para os coeficientes de difusão binária, D , das sulfonamidas sódicas, NaSD, NaSMR e NaSMT, em soluções aquosas e a diferentes concentrações, medidos a 298,15 K e 101,3 kPa, foram medidos em duplicado e encontram-se apresentados na tabela 3, e os valores obtidos para as ciclodextrinas, α -CD, β -CD e γ -CD, obtidos através da mesma técnica e publicados pelo mesmo grupo de investigação, encontram-se apresentados na tabela 4 [105–107]. Adicionalmente, foram determinados os valores limite dos coeficientes de difusão a concentração infinitesimal, D^0 , para todas as espécies.

Tabela 3 Coeficientes de difusão limite de NaSD, NaSMR e NaSMT em água a 298,15 K e 101,3 kPa.

$C / (\text{mol dm}^{-3})^{\text{a)}}$	$D \pm S_D /$ $(10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})^{\text{b)}}$	C.V. / (%) ^{c)}	$D^0 /$ $(10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})^{\text{d)}}$	R^2 ^{e)}
NaSD				
0,005	$0,965 \pm 0,000$	0,04	0,993	0,922
0,008	$0,956 \pm 0,017$	1,88		
0,010	$0,939 \pm 0,001$	0,1		
NaSMR				
0,005	$0,927 \pm 0,007$	0,8	0,948	0,980
0,008	$0,917 \pm 0,011$	1,23		
0,010	$0,906 \pm 0,004$	0,5		
NaSMT				
0,005	$0,901 \pm 0,003$	0,3	0,975	0,934
0,008	$0,842 \pm 0,013$	1,44		
0,010	$0,831 \pm 0,000$	0,02		

^{a)} Soluções de injeção = solução aquosa de concentração C .

^{b)} D corresponde à média dos valores dos coeficientes de difusão das NaSAs em solução aquosa e S_D representa o desvio padrão dessa média.

^{c)} C.V. representa o coeficiente de variação da média dos resultados experimentais, usualmente denominado como imprecisão.

^{d)} D^0 reflete o limite dos coeficientes de difusão a concentração infinitesimal obtidos pelas curvas de ajuste dos dados experimentais.

^{e)} Coeficiente de determinação.

Tabela 4 Coeficientes de difusão limite de α -CD, β -CD e γ -CD em água a 298,15 K e 101,3 kPa [105–107].

$C / (\text{mol dm}^{-3})^{\text{a)}}$	$D \pm S_D / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})^{\text{b)}}$	$D^0 / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})^{\text{c)}}$	$R^2^{\text{d)}}$
α-CD			
0,002	0,352 \pm 0,003	0,353	0,987
0,004	0,350 \pm 0,001		
0,006	0,349 \pm 0,003		
0,008	0,347 \pm 0,002		
0,010	0,346 \pm 0,001		
β-CD			
0,002	0,324 \pm 0,003	0,326	0,952
0,004	0,323 \pm 0,001		
0,006	0,321 \pm 0,003		
0,008	0,318 \pm 0,002		
γ-CD			
0,002	0,357 \pm 0,003	0,358	0,997
0,005	0,355 \pm 0,001		
0,008	0,353 \pm 0,003		
0,010	0,352 \pm 0,003		

^{a)} Soluções de injeção = solução aquosa de concentração C .

^{b)} D corresponde à média dos valores dos coeficientes de difusão das CDs em solução aquosa e S_D representa o desvio padrão dessa média.

^{c)} D^0 reflete o limite dos coeficientes de difusão a concentração infinitesimal obtidos pelas curvas de ajuste dos dados experimentais.

^{d)} Coeficiente de determinação.

A variação do coeficiente de difusão em função da concentração do soluto demonstra um comportamento linear, e a interseção com o eixo das ordenadas corresponde a D^0 , isto é, o valor que seria obtido quando a concentração da solução injetada tende para zero. Este valor fornece informações sobre a capacidade de difusão do soluto no solvente sem a

influência significativa da presença de outras entidades de soluto. Pela análise dos valores obtidos verifica-se que ocorre uma diminuição do valor de D à medida que a concentração do soluto em solução aquosa aumenta (declive negativo), ou seja, o valor de D^0 é maior que os valores de D para as restantes concentrações estudadas, sugerindo que a presença de outras entidades de soluto interfere na difusão e diminui a velocidade de movimento em solução aquosa. Este comportamento pode ocorrer devido a interações intermoleculares, como a formação de agregados, ou a obstrução da mobilidade devido ao aumento de colisões entre espécies. Todavia, como se observa uma tendência linear, com imprecisões inferiores a 2%, e a variação dos valores de D para o intervalo da concentração estudada, ($0,005 \leq C \leq 0,010 \text{ mol dm}^{-3}$) não varia de forma discrepante, os resultados sugerem que não ocorrem associações significativas entre as entidades de soluto nessa faixa de concentrações. Caso contrário, com o aumento da concentração as interações entre as entidades de soluto tenderiam a aumentar e formar-se-iam mais agregados, deixando de se observar o comportamento linear devido à diminuição abrupta dos valores de D como consequência da mobilidade em solução ser dificultada mais rapidamente.

A substituição consecutiva do anel pirimidínico nas estruturas das NaSAs por grupos metilo leva ao aumento da formação de água semelhante a um “iceberg” ao seu redor, sendo este comportamento detetado em estudos previamente realizados com as mesmas NaSAs [27]. As NaSAs atuam como solutos formadores de estrutura, em água, devido ao seu carácter hidrofóbico, sendo a ordem de hidrofobicidade: $\text{NaSMT} > \text{NaSMR} > \text{NaSD}$. Esta estruturação é maior para o caso da NaSMT, indicando uma maior interação entre as moléculas de água e NaSMT e uma maior formação de estruturas organizadas na água, o que justifica o menor valor de D^0 da NaSMT relativamente à NaSMR, apesar da ordem de hidrofobicidade indicada.

Os dados experimentais evidenciam valores mais altos para os coeficientes de difusão das NaSAs do que para os das CDs, mostrando uma menor resistência ao atrito do movimento através do líquido por parte das entidades de NaSAs, por serem mais pequenas e existir uma menor probabilidade de colidirem com outras entidades de NaSAs. Seguindo o mesmo raciocínio, dentro das NaSAs e CDs estudadas os coeficientes de difusão binários são maiores para as suas análogas mais pequenas ($\text{NaSD} > \text{NaSMR} > \text{NaSMT}$ e $\alpha\text{-CD} > \beta\text{-CD} > \gamma\text{-CD}$).

2.2. Difusão Isotérmica em Sistemas Ternários

Uma análise mais rigorosa deve considerar o efeito do fluxo de um componente da mistura na difusão do outro. Este efeito chama-se acoplamento de fluxos e pode ser analisado utilizando a teoria de Onsager [96,108]. Para o caso de um sistema ternário (antibiótico (componente 1) + macrociclo (componente 2) + água), os coeficientes de difusão mútua podem ser descritos pelas equações (2.4) e (2.5):

$$-J_1 = D_{11} \frac{\partial c_1}{\partial x} + D_{12} \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (2.4)$$

$$-J_2 = D_{21} \frac{\partial c_1}{\partial x} + D_{22} \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (2.5)$$

onde J_1 e J_2 são os fluxos molares dos componentes 1 e 2, respetivamente, impulsionados pelos gradientes de concentração do componente 1, $\partial c_1/\partial x$, e do componente 2, $\partial c_2/\partial x$. Os coeficientes de difusão principais, D_{11} e D_{22} , fornecem o fluxo de cada componente, 1 e 2, respetivamente, impulsionados pelo seu próprio gradiente de concentração. Os coeficientes secundários, D_{12} e D_{21} , fornecem o fluxo acoplado de cada componente, 1 e 2, impulsionado pelo gradiente de concentração do outro componente, 2 e 1, respetivamente. Um valor positivo para estes coeficientes, representado genericamente por D_{ik} ($i \neq k$), indica o transporte do soluto i desde regiões de mais alta concentração do soluto k para regiões de mais baixa concentração do mesmo soluto. Inversamente, um valor negativo para D_{ik} ($i \neq k$) indicará o transporte do soluto i desde regiões de mais baixa concentração do soluto k para regiões de mais alta concentração do mesmo soluto, ou seja, o componente i flui em contra-corrente com o componente j .

Os estudos de difusão intermolecular em sistemas ternários foram divididos em quatro secções, correspondentes aos resultados obtidos para cada um dos três antibióticos e à análise conjunta entre eles. Os sistemas ternários considerados são compostos por água, antibióticos (componente 1) e ciclodextrinas (componente 2), sendo necessários quatro coeficientes de difusão para descrever os sistemas: D_{11} , D_{12} , D_{21} e D_{22} .

2.2.1. Sulfadiazina de Sódio (NaSD)

Para avaliar o efeito da α -CD, β -CD e γ -CD em soluções aquosas de NaSD foram medidos, em duplicado, os coeficientes de difusão ternários presentes na tabela 5.

Tabela 5 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSD em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.

C_1 ^{a)}	C_2 ^{a)}	X_1 ^{b)}	$D_{11} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{12} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{21} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{22} \pm S_D$ ^{c)}
α-CD						
0,000	0,010	0,00	0,978 \pm 0,009	0,007 \pm 0,002	0,022 \pm 0,006	0,539 \pm 0,007
0,005	0,005	0,50	0,926 \pm 0,004	- 0,029 \pm 0,018	0,013 \pm 0,003	0,548 \pm 0,007
0,010	0,000	1,00	0,934 \pm 0,006	0,009 \pm 0,080	- 0,007 \pm 0,001	0,547 \pm 0,006
β-CD						
0,000	0,010	0,00	1,045 \pm 0,034	0,008 \pm 0,002	0,027 \pm 0,011	0,523 \pm 0,014
0,005	0,005	0,50	0,914 \pm 0,014	- 0,041 \pm 0,009	0,008 \pm 0,008	0,490 \pm 0,019
0,010	0,000	1,00	0,950 \pm 0,028	0,051 \pm 0,010	0,000 \pm 0,007	0,410 \pm 0,075
γ-CD						
0,000	0,010	0,00	0,987 \pm 0,014	0,012 \pm 0,004	0,031 \pm 0,005	0,479 \pm 0,001
0,005	0,005	0,50	0,932 \pm 0,012	- 0,072 \pm 0,006	0,012 \pm 0,005	0,498 \pm 0,004
0,010	0,000	1,00	0,935 \pm 0,007	0,074 \pm 0,012	- 0,005 \pm 0,002	0,503 \pm 0,002

^{a)} C_1 e C_2 representam a concentração dos componentes no fluxo em unidades mol dm⁻³.

^{b)} X_1 representa a fração molar de NaSD no fluxo.

^{c)} $D_{ij} \pm S_D$ corresponde aos coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões em unidades 10⁻⁹ m² s⁻¹.

2.2.2. Sulfamerazina de Sódio (NaSMR)

Para avaliar o efeito da α -CD, β -CD e γ -CD em soluções aquosas de NaSMR foram medidos, em duplicado, os coeficientes de difusão ternários presentes na tabela 6.

Tabela 6 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSMR em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.

C_1 ^{a)}	C_2 ^{a)}	X_1 ^{b)}	$D_{11} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{12} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{21} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{22} \pm S_D$ ^{c)}
α-CD						
0,000	0,010	0,00	1,007 \pm 0,010	0,014 \pm 0,006	- 0,004 \pm 0,000	0,549 \pm 0,002
0,025	0,075	0,25	0,892 \pm 0,009	-0,024 \pm 0,011	0,024 \pm 0,004	0,542 \pm 0,004
0,005	0,005	0,50	0,936 \pm 0,011	- 0,001 \pm 0,002	0,019 \pm 0,007	0,543 \pm 0,004
0,075	0,025	0,75	0,904 \pm 0,036	- 0,035 \pm 0,004	0,017 \pm 0,004	0,505 \pm 0,013
0,010	0,000	1,00	1,106 \pm 0,002	0,018 \pm 0,010	0,025 \pm 0,001	0,509 \pm 0,002
β-CD						
0,000	0,010	0,00	0,878 \pm 0,004	0,009 \pm 0,020	0,022 \pm 0,039	0,498 \pm 0,004
0,005	0,005	0,50	0,888 \pm 0,004	0,016 \pm 0,050	0,024 \pm 0,014	0,500 \pm 0,004
0,075	0,025	0,75	0,892 \pm 0,002	- 0,050 \pm 0,003	0,030 \pm 0,013	0,513 \pm 0,014
0,010	0,000	1,00	0,946 \pm 0,005	- 0,080 \pm 0,025	- 0,008 \pm 0,003	0,499 \pm 0,014
γ-CD						
0,000	0,010	0,00	0,964 \pm 0,019	0,010 \pm 0,001	0,015 \pm 0,004	0,519 \pm 0,002
0,025	0,075	0,25	0,888 \pm 0,002	- 0,036 \pm 0,000	0,008 \pm 0,000	0,491 \pm 0,000
0,005	0,005	0,50	0,975 \pm 0,006	- 0,033 \pm 0,002	0,006 \pm 0,001	0,540 \pm 0,000
0,075	0,025	0,75	0,926 \pm 0,010	- 0,057 \pm 0,008	- 0,015 \pm 0,003	0,560 \pm 0,003
0,010	0,000	1,00	1,111 \pm 0,003	- 0,145 \pm 0,016	0,029 \pm 0,002	0,482 \pm 0,009

^{a)} C_1 e C_2 representam a concentração dos componentes no fluxo em unidades mol dm⁻³.

^{b)} X_1 representa a fração molar de NaSMR no fluxo.

^{c)} $D_{ij} \pm S_D$ corresponde aos coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões em unidades 10⁻⁹ m² s⁻¹.

2.2.3. Sulfametazina de Sódio (NaSMT)

Para avaliar o efeito da α -CD, β -CD e γ -CD em soluções aquosas de NaSMT foram medidos, em duplicado, os coeficientes de difusão ternários presentes na tabela 7.

Tabela 7 Coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões da NaSMT em água (C_1) + α -CD, β -CD ou γ -CD (C_2), a 298,15 K e 101,3 kPa.

C_1 ^{a)}	C_2 ^{a)}	X_1 ^{b)}	$D_{11} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{12} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{21} \pm S_D$ ^{c)}	$D_{22} \pm S_D$ ^{c)}
α-CD						
0,000	0,010	0,00	0,881 \pm 0,036	0,009 \pm 0,008	0,034 \pm 0,017	0,556 \pm 0,005
0,005	0,005	0,50	0,862 \pm 0,018	- 0,054 \pm 0,009	0,011 \pm 0,009	0,530 \pm 0,006
0,010	0,000	1,00	0,854 \pm 0,024	0,028 \pm 0,009	- 0,016 \pm 0,015	0,524 \pm 0,006
β-CD						
0,000	0,010	0,00	0,811 \pm 0,019	0,018 \pm 0,016	0,052 \pm 0,005	0,534 \pm 0,011
0,005	0,005	0,50	0,829 \pm 0,002	- 0,063 \pm 0,005	0,019 \pm 0,003	0,505 \pm 0,004
0,010	0,000	1,00	0,855 \pm 0,022	0,063 \pm 0,008	- 0,014 \pm 0,013	0,501 \pm 0,006
γ-CD						
0,000	0,010	0,00	0,824 \pm 0,016	0,012 \pm 0,014	0,011 \pm 0,005	0,489 \pm 0,005
0,005	0,005	0,50	0,729 \pm 0,014	- 0,048 \pm 0,013	0,025 \pm 0,009	0,454 \pm 0,006
0,010	0,000	1,00	0,854 \pm 0,022	0,062 \pm 0,008	- 0,013 \pm 0,013	0,494 \pm 0,006

^{a)} C_1 e C_2 representam a concentração dos componentes no fluxo em unidades mol dm⁻³.

^{b)} X_1 representa a fração molar de NaSMT no fluxo.

^{c)} $D_{ij} \pm S_D$ corresponde aos coeficientes de difusão ternários e respectivos desvios padrões em unidades 10⁻⁹ m² s⁻¹.

2.2.4. Análise dos Estudos de Difusão Isotérmica em Sistemas Ternários

A análise dos coeficientes de difusão ternários apresenta uma maior complexidade quando comparada com a dos coeficientes de difusão binários, uma vez que os primeiros tomam em consideração as interações entre os fluxos dos solutos (NaSAs e CDs) e o solvente (água) e não apenas entre um dos solutos e o solvente. Ao comparar os valores obtidos para os coeficientes de difusão binários com os valores dos coeficientes de difusão principais verifica-se que os valores obtidos para D_{11} e D_{22} tendem a diminuir em relação aos valores obtidos para D , o que se deve à contribuição adicional da interação entre os solutos, no caso de D_{11} e D_{22} , que diminui a sua capacidade de difusão por estarem menos disponíveis para interagir apenas com as moléculas de água, como era o caso dos sistemas binários. A ocorrência desta diminuição não muito elevada indica que as entidades de soluto interagem fortemente com as moléculas de solvente. Observa-se ainda que os valores de D_{11} tendem a aumentar com o aumento de X_1 , enquanto D_{22} diminui com o aumento de X_1 , considerando as possíveis flutuações ocorrentes no sistema. Isto sugere, novamente, que o aumento da concentração dos componentes referidos em solução implicará uma maior resistência ao seu movimento, dificultando a sua difusão.

Quando $X_1 \rightarrow 0$, D_{11} representa o coeficiente de difusão do *tracer* das NaSAs em soluções aquosas de CDs. Nestas circunstâncias, $D_{12} = 0$, pois o gradiente de concentração das CDs não pode direcionar os fluxos acoplados de NaSAs em soluções onde este não esteja presente, apesar de os valores de D_{12} não serem exatamente nulos por existirem flutuações no sistema, ou seja, fatores não ideais que afetam a difusão, como efeitos de mistura, interações intermoleculares ou condições experimentais. Os valores positivos de D_{12} sugerem que as moléculas de CD co-transportam as entidades de NaSA, enquanto os valores negativos remetem para o seu contra-transporte. Observam-se valores negativos de D_{12} , os quais sugerem que as CDs formem complexos com as NaSAs, atuando como veículos transportadores para os antibióticos. Este processo leva à redução dos iões de NaSAs livres e, conseqüentemente, para compensar essa perda, ocorre um fluxo contra-corrente dos antibióticos de regiões de menor para maior concentração de CD. Os valores de D_{12} apresentam maiores contribuições com o aumento de X_1 . Até $X_1 = 0,5$ apenas se observa uma contribuição significativa de D_{12} correspondente à difusão das NaSAs influenciadas pelas CDs. Para valores maiores de X_1 , ou seja, quando a concentração de NaSAs se torna superior à de CDs, todas as moléculas de CDs parecem contra-transportar entidades de NaSAs, sendo este efeito muito baixo para o caso da α -CD, aumentando para a β -CD e

ainda mais para a γ -CD, onde se obtiveram os valores mais negativos, o que sugere uma melhor capacidade de acomodação das NaSAs. A NaSMR é o antibiótico que parece ter uma maior interação com as CDs, chegando a atingir o valor mais negativo de D_{12} com a γ -CD ($D_{12} \approx -1,45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para $X_1 = 1$).

Quando $X_1 \rightarrow 1$, D_{22} representa o coeficiente de difusão do *tracer* das CDs em soluções aquosas de NaSAs. Neste caso, $D_{21} = 0$, pois o gradiente de concentração das NaSAs não pode direcionar os fluxos acoplados de CDs em soluções onde este não esteja presente, apesar de os valores de D_{12} não serem exatamente nulos por existirem flutuações no sistema. Os valores de D_{21} são bastante baixos e positivos porque a dimensão das NaSAs é bastante inferior à das CDs e a sua estrutura não permite contra-transportar CDs da mesma forma que estas conseguem. Assim, observa-se o co-transporte das CDs por parte das NaSAs, através da colisão entre as entidades em solução.

Através de D_{12}/D_{22} estima-se o número de moles de NaSA contra-transportada por mole de CD, enquanto os valores de D_{21}/D_{11} indicam que uma mole de NaSA co-transporta determinado número de moles de CD. Os valores máximos para cada sistema, em módulo, estão representados na tabela 8.

Numa primeira análise verifica-se que os valores de D_{12}/D_{22} são sempre superiores aos valores de D_{21}/D_{11} . Isto deve-se, novamente, à dimensão e estrutura das entidades de NaSA, as quais apresentam uma massa molecular muito inferior à das CDs.

Os valores mais baixos de D_{12}/D_{22} foram registados para os sistemas ternários contendo α -CD e NaSAs, indicando que esta CD possui uma menor capacidade de contra-transportar as NaSAs estudadas por formar complexos de inclusão menos estáveis. Por outro lado, uma mole de γ -CD consegue contra-transportar 0,255 mol de NaSD e 0,301 mol de NaSMR e uma mole de β -CD consegue contra-transportar 0,331 mol de NaSMT, sendo estes os maiores valores registados, sugerindo que ambas as CDs têm capacidade para formar complexos de inclusão mais estáveis com as NaSAs, apesar de a γ -CD parecer ser mais eficiente.

Tabela 8 Razões máximas de D_{12}/D_{22} e D_{21}/D_{11} para cada sistema de NaSA e CDs.

NaSD		
	D_{12}/D_{22}	D_{21}/D_{11}
α -CD	0,126	0,022
β -CD	0,161	0,026
γ -CD	0,255	0,031
NaSMR		
	D_{12}/D_{22}	D_{21}/D_{11}
α -CD	0,035	0,023
β -CD	0,160	0,025
γ -CD	0,301	0,026
NaSMT		
	D_{12}/D_{22}	D_{21}/D_{11}
α -CD	0,155	0,039
β -CD	0,331	0,064
γ -CD	0,235	0,034

É importante avaliar a possível formação das estruturas supramoleculares hospedeiro-hóspede considerando os antibióticos e macrociclos estudados. Supondo que as CDs interagem com as NaSAs através da formação de um complexo com estequiometria 1 : 1, espera-se que tanto as CDs livres como as complexadas apresentem mobilidades semelhantes e, por sua vez, coeficientes de difusão semelhantes. Para perceber melhor o processo de formação destas estruturas através dos resultados obtidos pela difusão intermolecular recorreu-se a um modelo desenvolvido por Paduano *et al.* [109] para sistemas que envolvem a formação de complexos de inclusão. Através do modelo é possível estimar valores dos coeficientes de difusão mútua e compará-los com os valores obtidos experimentalmente, presentes nas tabelas 5, 6 e 7, através de um conjunto de equações que, apesar de serem aplicadas apenas a soluções diluídas, são bastante úteis para uma

compreensão qualitativa do processo referido. Considerando o equilíbrio descrito na equação (2.6) e a respetiva constante de equilíbrio, K , na equação (2.7).



$$K = \frac{c_3^*}{c_1^* c_2^*} \quad (2.7)$$

onde c_1^* corresponde à concentração de NaSA, c_2^* à concentração de CD e c_3^* à concentração de NaSA : CD.

A dependência que D_{11} , D_{12} , D_{21} e D_{22} têm das concentrações dos diferentes componentes pode ser descrita pelas equações (2.8), (2.9), (2.10) e (2.11), respetivamente.

$$D_{11} = D_3^* + (D_1^* - D_3^*) \left(\frac{\partial c_1^*}{\partial c_1} \right) \quad (2.8)$$

$$D_{12} = (D_1^* - D_3^*) \left(\frac{\partial c_1^*}{\partial c_2} \right) \quad (2.9)$$

$$D_{21} = (D_2^* - D_3^*) \left(\frac{\partial c_2^*}{\partial c_1} \right) \quad (2.10)$$

$$D_{22} = D_3^* + (D_2^* - D_3^*) \left(\frac{\partial c_2^*}{\partial c_2} \right) \quad (2.11)$$

onde c_1 e c_2 são as concentrações estequiométricas de NaSA e CD, respetivamente, e D_1^* (D_{11} para $X_1 = 1$), D_2^* (D_{22} para $X_1 = 0$) e D_3^* correspondem à difusividade das espécies efetivamente presentes na solução. Através da aplicação da equação (2.12) é possível estimar os valores dos coeficientes de difusão dos complexos considerados, D_j , representados na tabela 9.

$$D [(\text{NaSA}) - (\text{CD})] = [D (\text{NaSA})^{-3} + D (\text{CD})^{-3}]^{-1/3} \quad (2.12)$$

Tabela 9 Coeficientes de difusão limite para os diferentes complexos considerados, j , no sistema ternário.

	$D_j / (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
NaSD : α -CD	0,508
NaSD : β -CD	0,498
NaSD : γ -CD	0,459
NaSMR : α -CD	0,528
NaSMR : β -CD	0,476
NaSMR : γ -CD	0,502
NaSMT : α -CD	0,513
NaSMT : β -CD	0,497
NaSMT : γ -CD	0,462

O facto de os valores de D_j se assemelharem mais aos valores de D_{22} do que aos valores de D_{11} pode indicar que os complexos de inclusão formados são relativamente estáveis e que as NaSAs estão bem encapsuladas nas cavidades das CDs.

Por fim, é possível construir um gráfico representativo dos valores previstos para os coeficientes de difusão ternários, determinados através do modelo aplicado, de forma a compará-los com os valores experimentais, para diferentes valores da K (10, 20, 30, 50 e 100 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$). Sendo D_{12} o mais relevante para avaliar o efeito das CDs na difusão dos antibióticos, apenas foram construídos gráficos para esse coeficiente de difusão, e como se obtiveram resultados mais promissores para os sistemas com a NaSMR optou-se por estudar apenas as previsões da K para este antibiótico. Estes ajustes encontram-se ilustrados nas figuras 10, 11 e 12 e correspondem à interação entre a NaSMR e a α -CD, β -CD e γ -CD, respetivamente.

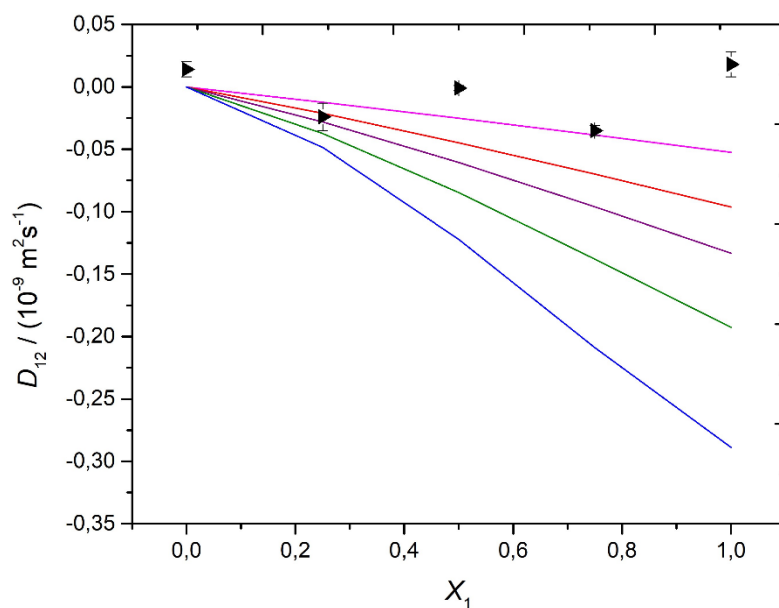


Figura 10 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + α -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (\blacktriangleright) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$.

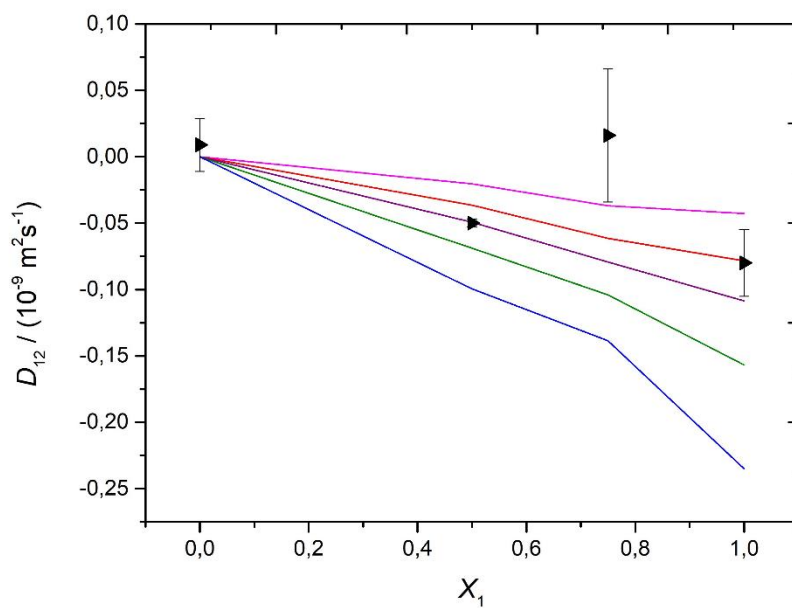


Figura 11 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + β -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (\blacktriangleright) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$.

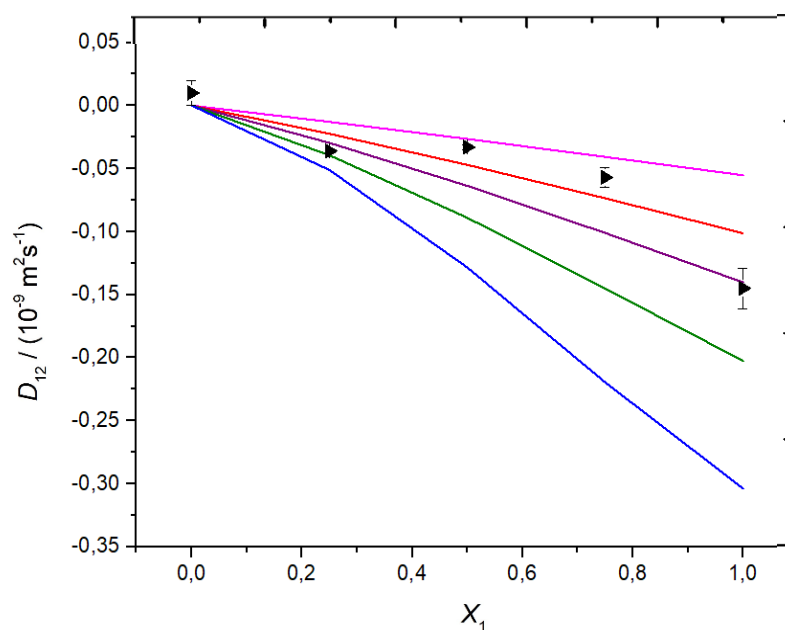


Figura 12 Valores de D_{12} do sistema NaSMR + β -CD em função da fração de NaSMR, X_1 , a $T = 298,15$ K. Valores experimentais (\blacktriangleright) e valores teóricos calculados para diferentes valores de constantes de associação: 10 (—), 20 (—), 30 (—), 50 (—) e 100 (—) $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$.

É importante referir que os valores de D_{12} , que foram estimados para os diferentes valores de K , apresentam valores negativos, aumentando, em valor absoluto, com o aumento de X_1 , e indicando, novamente, que o gradiente de concentração das CDs gera fluxos acoplados de contra-corrente de NaSAs, contribuindo para a formação de complexos 1 : 1. A análise dos gráficos das figuras 10, 11 e 12 permite concluir que o modelo aplicado aproxima os valores experimentais de D_{12} para constantes de equilíbrio até 10 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ no caso da α -CD, até 20 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ para a β -CD e até 30 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ com a γ -CD, respetivamente.

2.3. Determinação de Propriedades de Transporte das Sulfonamidas de Sódio (NaSAs)

As NaSAs são consideradas eletrólitos fortes e dissociam-se em solução aquosa nos seus iões Na^+ e SA^- . As moléculas de água orientam-se em torno dos iões devido a interações eletrostáticas entre as cargas dos iões e as moléculas de água, levando à formação de uma camada de moléculas de água que circunda o ião, conhecida como camada de solvatação/hidratação. Esta orientação ocorre com as regiões parcialmente negativas dos dipolos da água (átomos de oxigénio) voltadas para o catião Na^+ e com as regiões

parcialmente positivas dos seus dipolos (átomos de hidrogénio) voltadas para o anião SA^- [110].

As propriedades de transporte dos antibióticos em solução aquosa podem ser complementadas com estudos de difusão e de condutibilidade. Juntos, são usados para compreender como os iões se deslocam e se distribuem na água.

O valor de $D_{Na^+}^0 = 1,33 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ foi calculado a partir da condutividade limite conhecida do Na^+ , $\lambda_{Na^+}^0 = 5,01 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$ [111], usando a equação (2.13). A condutividade limite descreve a condutividade elétrica específica de uma substância em concentração infinitamente diluída, sem interferência significativa de outras espécies químicas em solução, permitindo avaliar a sua capacidade para conduzir corrente elétrica.

$$D_i^0 = \frac{RT\lambda_i^0}{(Fz_i)^2} \quad (2.13)$$

onde F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e z_i é a valência algébrica da espécie iónica i . Através desta expressão também foram calculados os valores de $\lambda_{SD^-}^0 = 2,97 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$, $\lambda_{SMR^-}^0 = 2,76 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$ e $\lambda_{SMT^-}^0 = 2,89 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Os coeficientes de difusão binários mútuos limitantes de cada NaSA, D_{NaSA}^0 , são uma média ponderada dos coeficientes de difusão limitantes do Na^+ , $D_{Na^+}^0$, e do anião SA^- , $D_{SA^-}^0$, e podem relacionar-se através da equação de Nernst (2.14).

$$D_{NaSA}^0 = \frac{D_{Na^+}^0 D_{SA^-}^0}{D_{Na^+}^0 + D_{SA^-}^0} \quad (2.14)$$

Os valores de D_{NaSA}^0 para as três NaSAs estudadas foram extrapolados através dos dados obtidos para os coeficientes de difusão binários mútuos para diferentes concentrações, D , presentes na tabela 3. Por conseguinte, foram calculados os valores $D_{SD^-}^0 = 0,79 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{SMR^-}^0 = 0,74 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $D_{SMT^-}^0 = 0,77 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Para manter a eletroneutralidade ao longo do percurso de difusão, considera-se que os iões SA^- se difundem na mesma velocidade que os contra-iões Na^+ , menores e mais móveis. Como resultado, os valores de D_{NaSA}^0 são significativamente maiores que os valores de $D_{SA^-}^0$.

A equação de Stokes–Einstein (2.15) relaciona o coeficiente de difusão (mobilidade) com o atrito ao movimento (viscosidade) e permite estimar o tamanho das entidades de soluto tratadas como partículas brownianas imersas num fluido contínuo.

$$D_i^0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_{hi}} \quad (2.3.3)$$

onde R_{hi} , k_B , η_0 e T são o raio hidrodinâmico de uma partícula esférica equivalente com coeficiente de difusão D_i^0 , a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e a viscosidade do solvente, neste caso da água (0,89 cP), à temperatura T . Esta relação foi usada para calcular $R_{hi}(\text{SD}^-) = 3,10 \text{ \AA}$, $R_{hi}(\text{SMR}^-) = 3,34 \text{ \AA}$ e $R_{hi}(\text{SMT}^-) = 3,19 \text{ \AA}$.

O R_{hi} pode ser definido como o raio de uma esfera rígida que teria o mesmo comportamento hidrodinâmico, ou seja, a mesma resistência ao movimento, que a partícula real quando está em solução e interage com a camada de solvatação [111]. Esta camada corresponde à região de moléculas de solvente, como a água, que envolve uma partícula de soluto quando ela está dissolvida nesse solvente, podendo variar dependendo das entidades envolvidas e das condições da solução. O R_{hi} é ambíguo e uma simplificação útil do tamanho aparente das partículas para descrever o seu comportamento em solução e compreender a interação com o solvente [112].

Tendo em conta a estrutura dos iões SA^- , o seu carácter hidrofóbico é crescente com a substituição do anel pirimidínico por grupos metilo ($\text{SD}^- < \text{SMR}^- < \text{SMT}^-$), mas a sua difusão em solução aquosa ($\text{SMR}^- < \text{SMT}^- < \text{SD}^-$) e o respetivo R_{hi} estimado ($\text{SD}^- < \text{SMT}^- < \text{SMR}^-$) não seguem a mesma tendência, o que pode dever-se a um efeito competitivo entre diferentes tipos de interações.

A menor superfície hidrofóbica de SD^- leva a uma menor estruturação das moléculas de água ao redor das partes apolares, o que reflete o menor R_{hi} e a maior mobilidade dos iões em solução aquosa comparativamente aos restantes iões SA^- . Já o ião SMT^- apresenta a maior superfície hidrofóbica deste grupo de iões, mas a sua mobilidade é maior que o ião SMR^- , quando se considera o efeito de difusão livre de outras entidades de soluto em solução aquosa (D^0), e o R_{hi} é menor. A substituição do anel pirimidínico com os grupos metilo, no caso do SMT^- , parece favorecer a interação por pontes de hidrogénio entre as moléculas de água e os átomos de nitrogénio do anel heteroaromático. Isto pode ocorrer porque esta parte do anião com a maior superfície hidrofóbica provoca uma maior organização da água ao redor dessa zona, o que pode resultar numa estruturação mais significativa da água nessas

regiões não polares para minimizar o seu contacto. Essas pontes de hidrogénio parecem ser mais fortes e numerosas na SMT^- do que na SMR^- , no qual a substituição de apenas um grupo metilo não melhora significativamente a magnitude da interação por pontes de hidrogénio entre os átomos de nitrogénio do anel e as moléculas de água. Neste caso a estruturação da água não é tão pronunciada.

A estruturação da água não mostra resistência à difusão de SMT^- em solução aquosa devido às pontes de hidrogénio favoráveis que criam uma situação em que a mobilidade iónica deste ião é superior à do ião SMR^- menos hidrofóbico. A maior estruturação da água para a $NaSMT$ já tinha sido considerada anteriormente no estudo dos coeficientes de difusão binários (subcapítulo 2.1).

Estes resultados são corroborados por medições de condutividades iónicas realizadas para os mesmos sais de NaSAs [27]. Mostra-se que o ião SD^- não apresenta hidratação apreciável durante o processo de transporte, de acordo com o R_{hi} , e possui uma maior condutividade em consequência de não arrastar consigo moléculas de água. Além disso, também se observou, para a temperatura considerada (25 °C), que os iões SMR^- e SMT^- se encontram hidratados, com maior intensidade para o ião SMR^- , de acordo com o R_{hi} , o que confere uma maior condutividade ao SMT^- e, portanto, maior mobilidade relativamente ao SMR^- .

Deste modo, as mobilidades limitantes dos iões de SA^- derivadas independentemente das medições de difusão e das medições de condutividade estão em boa concordância. É importante ter em conta que estes efeitos podem variar dependendo das condições experimentais, como a temperatura e concentração, mas fornecem uma compreensão sólida das diferenças observadas nas propriedades de solubilidade (tabela 1) e difusão.

Comparando os valores obtidos para os R_{hi} dos iões SA^- com o tamanho das cavidades das CDs na tabela 2, verifica-se que a α -CD tem uma cavidade muito pequena para acomodar os aniões SA^- , podendo existir apenas uma interação parcial com uma parte do ião. A cavidade da β -CD aproxima-se do R_{hi} dos iões SA^- , podendo ocorrer também uma interação parcial com uma parte dos iões SA^- ou uma alteração da conformação destes para interagirem melhor na cavidade das CDs. Já a γ -CD tem uma cavidade superior aos R_{hi} dos iões SA^- , possibilitando o encapsulamento com uma maior parte da estrutura dos iões ou com uma porção dela no caso de não existir complementaridade geométrica que favoreça interações não covalentes da primeira forma.

Capítulo 3

3. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta–visível

Na espectroscopia de absorção UV–vis utiliza-se radiação eletromagnética na zona do ultravioleta (200–400 nm) e/ou radiação na zona do visível (400–800 nm). É possível medir a intensidade da luz absorvida pela amostra porque a energia dos estados energéticos se encontra quantizada. Deste modo, a redução da intensidade da luz transmitida em determinados comprimentos de onda será proporcional à quantidade exata que foi absorvida, sendo possível medir-se a absorvância num espectrofotómetro, desde que a amostra apresente cromóforos na sua estrutura, isto é, grupos funcionais capazes de absorver radiação na região da radiação incidente UV–vis [113].

A relação entre a concentração do material na qual a luz incide e a quantidade de luz absorvida por ele é expressa através da lei de Beer–Lambert **(3.1)**, sendo apenas válida para soluções diluídas, geralmente com concentrações inferiores a 10^{-3} mol dm⁻³.

$$A = \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \quad (3.1)$$

onde A corresponde à absorvância, I e I_0 são a intensidade da radiação transmitida e a intensidade da radiação incidente, respetivamente, ϵ é a absortividade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l é o percurso ótico (cm) e c corresponde à concentração (mol dm^{-3}) da solução em análise [114].

A faixa de concentrações adequadas para medidas quantitativas através desta lei é aquela em que a relação entre a absorvância e a concentração é linear ($A < 1$). Fora dessa gama podem ocorrer desvios devido a interações que envolvam os centros absorventes, desvios reais, desvios relativos à variação do índice de refração com a concentração, desvios químicos e desvios instrumentais [115].

A interação entre a radiação e as moléculas induz transições entre estados eletrónicos, sendo para isso necessário que a energia da radiação eletromagnética incidente seja igual à diferença de energia entre o estado eletrónico fundamental e o estado excitado da molécula. Neste sentido, a espectroscopia de absorção no UV–vis promove a passagem de um eletrão a partir da orbital molecular de maior energia ocupada (HOMO) para uma orbital molecular de menor energia não ocupada (LUMO), sendo as transições observadas no espectro de

Capítulo 3. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-visível

absorção. As bandas de absorção correspondem a transições de elétrons em orbitais não ligantes, n , ou ligantes, π , para orbitais anti-ligantes ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) [116]. A probabilidade de transição é medida em termos de absorvância e a de absorvidade molar [117].

A utilização de UV-vis para seguir e quantificar a complexação entre CDs e NaSAs requer que as espécies de NaSA apresentem uma sonda com grande intensidade de absorvância que mude com a adição de uma pequena quantidade de CD, o que implica que a constante de associação não pode ser muito baixa. O método de Benesi-Hildebrand é uma abordagem matemática para o cálculo da constante de associação de complexos de inclusão [118].

Assumindo as concentrações iniciais de CD e NaSA como $[CD]_0$ e $[NaSA]_0$, respetivamente, onde $[CD]_0 \gg [NaSA]_0$, e a concentração do complexo como x , pode-se representar a constante de associação para complexos CD : NaSA (1 : 1), $K_{1,1}$, na forma da equação (3.2).

$$K_{1,1} = \frac{([CD]_0 - x) ([NaSA]_0 - x)}{x} \quad (3.2)$$

Aplicando a lei de Beer-Lambert, (3.1), e sabendo que o comprimento do caminho ótico é 1 cm, é possível descrever a absorvância no comprimento de onda máximo de absorção das NaSAs através da equação (3.3).

$$A = \epsilon_{CD} ([CD]_0 - x) + \epsilon_{NaSA} ([NaSA]_0 - x) + \epsilon_{CD-NaSA} x \quad (3.3)$$

onde ϵ_{CD} , ϵ_{NaSA} e $\epsilon_{CD-NaSA}$ são as absorvidades molares de CD, NaSA e CD-NaSA, respetivamente. Combinando as equações (3.2) e (3.3) obtém-se a equação (3.4).

$$\frac{A - \epsilon_{CD} [CD]_0 - \epsilon_{NaSA} [NaSA]_0}{\epsilon_{CD-NaSA} - \epsilon_{CD} - \epsilon_{NaSA}} = \frac{[CD]_0 [NaSA]_0}{K + [CD]_0} \quad (3.4)$$

Como as CDs não absorvem radiação na gama do UV-vis, ϵ_{CD} pode ser desprezado relativamente aos outros valores de ϵ . Assumindo $\Delta A = A - \epsilon_{CD} [CD]_0 - \epsilon_{NaSA} [NaSA]_0$ e $\Delta \epsilon = \epsilon_{CD-NaSA} - \epsilon_{NaSA}$ é possível simplificar a equação (3.4) e, por fim, obter a equação (3.5), referente ao método de Benesi-Hildebrand.

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon [NaSA]_0 K [CD]} + \frac{1}{\Delta \epsilon [NaSA]_0} \quad (3.5)$$

onde ΔA e $\Delta \varepsilon$ são a diferença entre as absorvâncias e absortividade molares, respetivamente, entre o hóspede livre e complexado, $[NaSA]_0$ corresponde à concentração de NaSA inicial, $[CD]$ corresponde à concentração de CD e K é a constante de associação. O valor de K pode ser calculado através da regressão obtida pelo gráfico de $1/\Delta A$ em função de $1/[CD]$ [119].

Para sistemas com interações fracas ou fortes a aplicação do método de Benesi–Hildebrand pode levar a parâmetros de ajuste não fidedignos. Além disso, há algumas condições necessárias, mas não suficientes, que devem ser tomadas em consideração para garantir a precisão no processo de ajuste, nomeadamente $1/(K_0[CD]) \geq 10$ e $[CD]/[NaSA] > 100$, tendo em conta que o excesso de CD possibilita o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do complexo de inclusão [120,121].

3.1. Interação entre CDs e NaSAs por UV-vis

Foram obtidos espectros de absorção de UV-vis das NaSAs, com concentração definida ($0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$), na ausência e na presença de CDs a diferentes concentrações ($0, 6, 8, 10$ e 12 mmol dm^{-3}). Não existem bandas de absorção das CDs no UV-vis devido à ausência de eletrões π e eletrões não ligantes, pelo que é possível avaliar a influência da presença das CDs em solução aquosa. De todos os sistemas estudados, apenas foram observadas alterações ligeiras nos espectros de absorção de UV-vis da NaSMR na presença de β -CD e γ -CD, representados na figura 13.A e 14.A, respetivamente. Considerando a variação da intensidade de absorção no comprimento de onda de absorvância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) foram traçados os gráficos das figuras 13.B e 14.B, através da aplicação da equação (3.5), a partir dos quais foi possível calcular os valores de K para ambos os sistemas.

O espectro de absorção de UV-vis da NaSMR na ausência de CDs apresenta um pico máximo de absorção a 259 nm e um ombro a 240 nm, os quais podem ser atribuídos a transições eletrónicas $\pi-\pi^*$ dos anéis aromáticos. Para a análise dos resultados foi considerado o pico de maior intensidade devido à melhor sensibilidade analítica.

As figuras 13.B e 14.B mostram uma boa relação linear, com R^2 igual a 0,956 e 0,983, respetivamente, indicando que a razão estequiométrica para a formação do complexo de inclusão entre a NaSMR e as CDs é de 1 : 1, como está relatado na literatura [122].

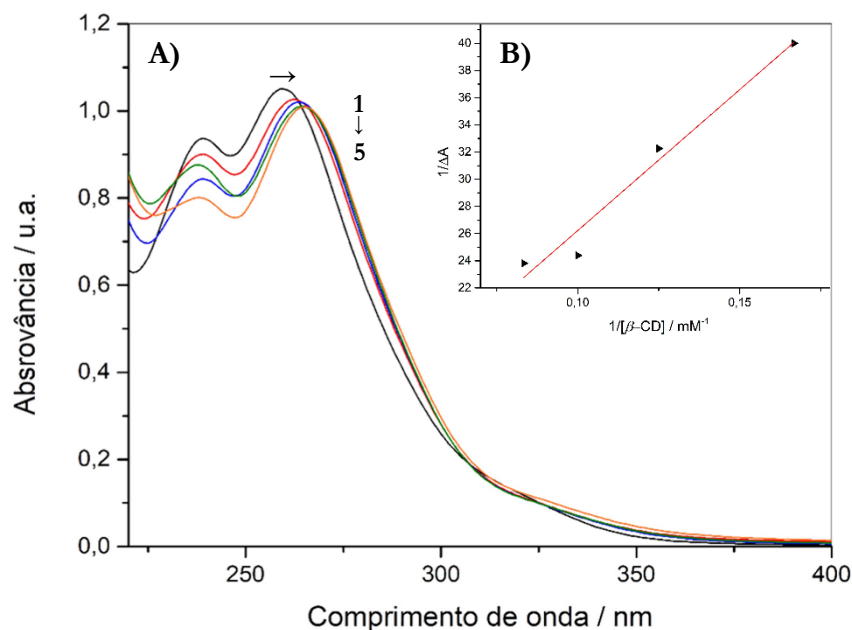


Figura 13 A) Espectros de absorção UV-vis da NaSMR ($0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$) na presença de diferentes concentrações de β -CD ordenadas de 1 a 5: 0 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—) e 12 (—) mmol dm^{-3} , respectivamente; **B)** Ajuste linear da equação (3.2) aos dados experimentais obtidos por UV-vis com regressão $\frac{1}{\Delta A} = 207,489 \frac{1}{[\beta\text{-CD}]} + 5,475$ e $R^2 = 0,956$.

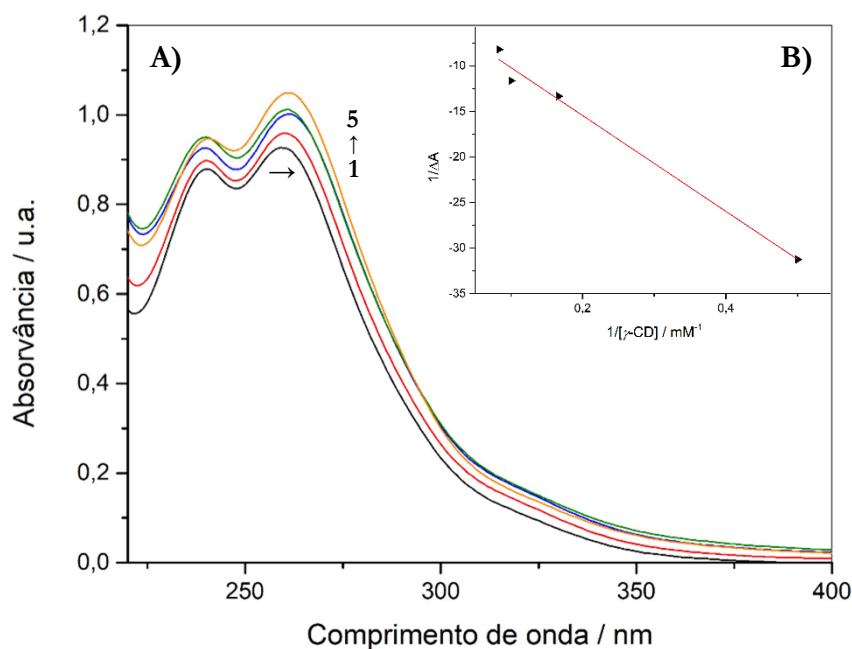


Figura 14 A) Espectros de absorção UV-vis da NaSMR ($0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$) na presença de diferentes concentrações de γ -CD ordenadas de 1 a 5: 0 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—) e 12 (—) mmol dm^{-3} , respectivamente; **B)** Ajuste linear da equação (3.2) aos dados experimentais obtidos por UV-vis com regressão $\frac{1}{\Delta A} = -52,643 \frac{1}{[\gamma\text{-CD}]} - 4,915$ e $R^2 = 0,983$.

Capítulo 3. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-visível

Pela análise das figuras 12.A e 13.A verificam-se alterações nos espectros de absorção UV-vis da NaSMR. Com o aumento da concentração de β -CD, as bandas de absorção da NaSMR mostram uma diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocrômico), enquanto com o aumento da concentração da γ -CD mostraram um aumento da intensidade de absorção (efeito hiperacrômico), embora a concentração de NaSMR tenha sido mantida constante. Adicionalmente, ocorreu, para ambos os casos, um desvio para valores de comprimentos de onda maiores (desvio batocrômico), sendo este mais acentuado no caso da interação entre a NaSMR e a β -CD (259 até 265 nm) do que para a interação com a γ -CD (259 até 261 nm).

As variações registradas são indicativas de uma mudança do microambiente da NaSMR como consequência da sua complexação na cavidade das CDs. Nesta situação, ocorre a blindagem dos elétrons do cromóforo excitável da NaSMR e a substituição parcial da camada de solvatação ao seu redor, passando de um meio polar para um meio apolar. Durante o processo podem ocorrer alterações na estrutura eletrônica das entidades de NaSMR, na conjugação dos sistemas π do cromóforo ou outras interações moleculares que levem a uma alteração na absorção de luz.

As tendências relatadas demonstram que a β -CD e a γ -CD interagem com a NaSMR por processos diferentes. Essas diferenças podem ser atribuídas às características estruturais e propriedades específicas das CDs utilizadas, à natureza da interação entre as CDs e a NaSMR ou até às condições experimentais utilizadas, como a concentração, pH, força iônica e outros parâmetros estruturais. As entidades de NaSMR podem adotar uma conformação que na cavidade da γ -CD permita uma maior sobreposição das orbitais eletrônicas relevantes para a absorção de luz (efeito hiperacrômico) e que na cavidade da β -CD adote uma conformação diferente que não permita essa mesma sobreposição (efeito hipocrômico). No entanto, estes efeitos não são indicativos de uma melhor ou pior capacidade de encapsulamento.

Através das regressões lineares obtidas pelos gráficos das figuras 12.B e 13.B, confirmando a estequiometria 1 : 1 para o complexo de inclusão, é obtido um valor de K para o sistema β -CD + NaSMR de $26 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ e para o sistema γ -CD + NaSMR de $93 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Novamente, a γ -CD parece apresentar uma maior capacidade de inclusão que pode ser justificada pelo tamanho maior da cavidade que permite uma geometria mais estável do complexo de inclusão formado.

Capítulo 3. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-visível

Capítulo 4

4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Na espectroscopia de RMN utiliza-se radiação eletromagnética na zona da radiofrequência. Os núcleos atômicos são expostos a um campo magnético externo que provoca o alinhamento dos spins nucleares ao longo de uma direção específica. De seguida, a aplicação de pulsos de radiofrequência excita os núcleos para um estado de energia mais alto, resultando na absorção de energia eletromagnética, e ao retomarem ao estado original emitem um sinal de radiofrequência detetável. A frequência do sinal emitido está relacionada com a ressonância e com as propriedades magnéticas dos núcleos em questão. O espectro obtido fornece informações sobre as ligações e o ambiente químico ao redor de cada núcleo, uma vez que a partilha de elétrons afeta o campo magnético sentido pelo núcleo [123].

Esta é uma das técnicas mais utilizadas na investigação da estabilidade, estequiometria e geometria de inclusão de complexos hospedeiro-hóspede em solução [124]. A formação de complexos de inclusão entre CDs e entidades de antibiótico provoca perturbações no microambiente químico e magnético dos hidrogénios das entidades envolvidas, o que se deve à proximidade espacial das entidades de antibiótico na cavidade da CD e à alteração da polaridade do meio em que ambas se encontravam antes da interação (solvatadas). Consequentemente, a alteração na distribuição eletrónica desses núcleos manifesta-se nos espectros de RMN através da variação do desvio químico e alteração do perfil do sinal [125]. Por se tratarem de interações não covalentes, as variações no desvio químico podem estar limitadas a décimos de ppm [126].

As CDs apresentam na sua estrutura de cone truncado dois protões localizados na superfície interna (H_3 e H_5), um protão na borda da cavidade na extremidade estreita (H_6) e três protões na superfície externa (H_1 , H_2 e H_4), como está representado na figura 15 [127].

A complexação das CDs pelas NaSAs induz mudanças na blindagem dos protões devido à proximidade entre eles, o que geralmente resulta em mudanças de desvios químicos dos protões de ambos. Isso pode, portanto, fornecer informações sobre a geometria do complexo de inclusão formado, ou seja, a localização estrutural das NaSAs dentro das CDs, revelando quais os protões das NaSAs que são encapsulados pelas CDs.

Capítulo 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

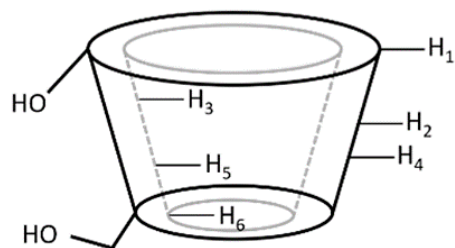


Figura 15 Representação espacial dos prótons na estrutura de cone truncado das CDs.

As aparências da mudança das ressonâncias dos prótons podem variar, dependendo se a velocidade de troca é rápida ou lenta na escala de tempo do RMN prótonico (^1H -RMN). No caso de complexos hospedeiro-hóspede, a interconversão entre o estado livre e o estado complexado para um determinado núcleo depende da diferença de frequência entre os dois estados do núcleo. Se a troca de um núcleo entre dois estados for mais rápida do que a diferença de frequência entre os dois estados, diz-se que o sistema exibe um comportamento de troca rápida e apenas se observa um espectro médio do complexo. Pelo contrário, se a taxa de troca de um núcleo entre os dois estados for mais lenta do que a diferença nas frequências entre os dois estados, o sistema é considerado de troca lenta em comparação com a escala de tempo do ^1H -RMN e ambas as espécies livres e complexadas podem ser vistas no espectro. Há também um caso em que a troca de próton ocorre numa escala de tempo semelhante à escala de tempo do ^1H -RMN, o que leva a um alargamento dos picos das espécies.

Assumindo que se forma um complexo de inclusão 1 : 1 (CD : NaSA), a estabilidade deste complexo pode ser descrita em termos da constante de associação da equação (4.1).

$$K_{1,1} = \frac{[\text{CD-NaSA}]}{[\text{CD}]_L [\text{NaSA}]_L} \quad (4.1)$$

onde $[\text{CD}]_L$ e $[\text{NaSA}]_L$ são as concentrações de espécies não complexadas (livres) no sistema. A conservação de massa, $[\text{NaSA}]_L = [\text{NaSA}]_T - [\text{CD-NaSA}]$, onde $[\text{NaSA}]_T$ e $[\text{CD}]_T$ são a concentração total de NaSA e CD, respetivamente, permite reescrever a equação de equilíbrio na forma da equação (4.2).

$$K_{1,1} = \frac{L}{(1-L) ([\text{CD}]_T - L [\text{NaSA}]_T)} \quad (4.2)$$

onde L é a fração de NaSA complexada com CD. Assumindo a condição de troca rápida na escala de tempo do ^1H -RMN, o deslocamento químico observado para a CD pode ser

Capítulo 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

expresso como $\delta_{\text{obs}} = (1 - L) \delta_{\text{CD,L}} + L \delta_{\text{CD-NaSA}}$, onde $\delta_{\text{CD,L}}$ e $\delta_{\text{CD-NaSA}}$ representam o desvio químico de um dado núcleo quando livre e complexado, respectivamente. A mudança do desvio químico de um determinado núcleo da CD, na presença e ausência de uma entidade de NaSA, $\Delta\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{CD}}$, pode ser expressa na forma da equação (4.3).

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{CD-NaSA}}}{[\text{CD}]_{\text{T}}} [\text{CD-NaSA}] \quad (4.3)$$

que depois de alguma algébrica e simplificação resulta na equação (4.4).

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{CD-NaSA}}}{2 [\text{CD}]_{\text{T}}} \left\{ \left([\text{NaSA}]_{\text{T}} + [\text{CD}]_{\text{T}} + \frac{1}{K_{1,1}} \right) - \left(([\text{NaSA}]_{\text{T}} + [\text{CD}]_{\text{T}} + \frac{1}{K_{1,1}})^2 - 4 ([\text{NaSA}]_{\text{T}} + [\text{CD}]_{\text{T}}) \right)^{1/2} \right\} \quad (4.4)$$

A equação (4.4) é ajustada aos dados experimentais usando um algoritmo não linear de mínimos quadrados para obter os parâmetros de ajuste $K_{1,1}$ e $\Delta\delta_{\text{CD-NaSA}}$ [121].

4.1. Interação entre CDs e NaSAs por ^1H -RMN

Através de ^1H -RMN estudou-se a influência da adição de soluções de NaSAs a soluções de CDs e apenas foram obtidos desvios significativos para o sistema β -CD + NaSMR, passando a estudar-se de seguida.

Nas figuras 16.A e 16.B estão representadas as estruturas moleculares com a numeração dos prótons da β -CD e NaSMR e nas figuras 17, 18 e 19 encontram-se os espectros de ^1H -RMN obtidos para uma solução de 5 mmol dm^{-3} β -CD, 5 mmol dm^{-3} NaSMR e $(5 : 5) \text{ mmol dm}^{-3}$ β -CD/NaSMR, respectivamente. Na tabela 10 estão registados os parâmetros de ^1H -RMN da β -CD na ausência e na presença de NaSMR e na tabela 11 estão os parâmetros de ^1H -RMN da NaSMR na ausência e na presença de β -CD.

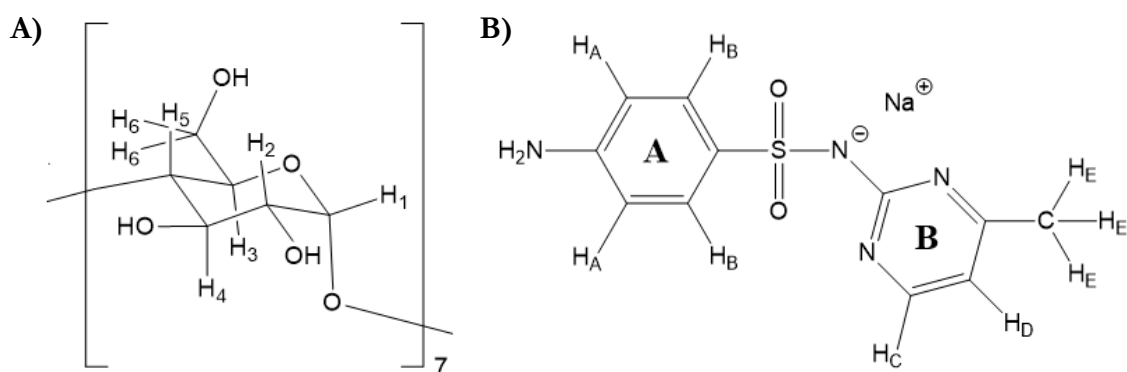


Figura 16 Representação da posição dos prótons na estrutura molecular da **A)** β -CD e **B)** NaSMR.

O espectro de ^1H -RMN da β -CD na presença de NaSMR, numa razão molar 1 : 1 ($5 : 5 \text{ mmol dm}^{-3}$) mostra uma pequena variação no desvio químico dos prótons H_3 e H_5 para valores de campo mais alto, enquanto os restantes prótons mostram variações pouco significativas, causadas, possivelmente, por flutuações ocorridas na preparação das soluções. Adicionalmente, verifica-se uma modificação do perfil do sinal dos prótons H_5 e H_6 , ocorrendo um desdobramento e alargamento dos picos, o que pode indicar uma dinâmica de troca lenta na escala de tempo do RMN, especificamente para esta posição. Estas alterações no perfil do espectro de ^1H -RMN da β -CD demonstram que a adição da NaSMR provoca uma alteração no ambiente químico dos prótons internos da β -CD com uma maior rigidez na região dos prótons H_5 e H_6 . Também são observadas alterações nos desvios químicos dos sinais referentes aos prótons da NaSMR, mais significativas do que para a β -CD. O maior desvio registado corresponde ao H_A , para o qual também se observa uma variação da constante de acoplamento, o que sugere que a interação entre as duas espécies provoca uma alteração conformacional na estrutura da NaSMR. Para a β -CD não ocorre alteração da constante de acoplamento, pelo que mantém a sua conformação.

Utilizando várias soluções com diferentes razões molares $[\beta\text{-CD}]/[\text{NaSMR}]$ (0,6; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0) e mantendo $[\beta\text{-CD}]$ constante (método de titulação), observa-se o efeito provocado nos espectros de ^1H -RMN da figura 20, referente a uma expansão dos espectros numa gama que engloba os desvios químicos dos prótons internos da cavidade da β -CD.

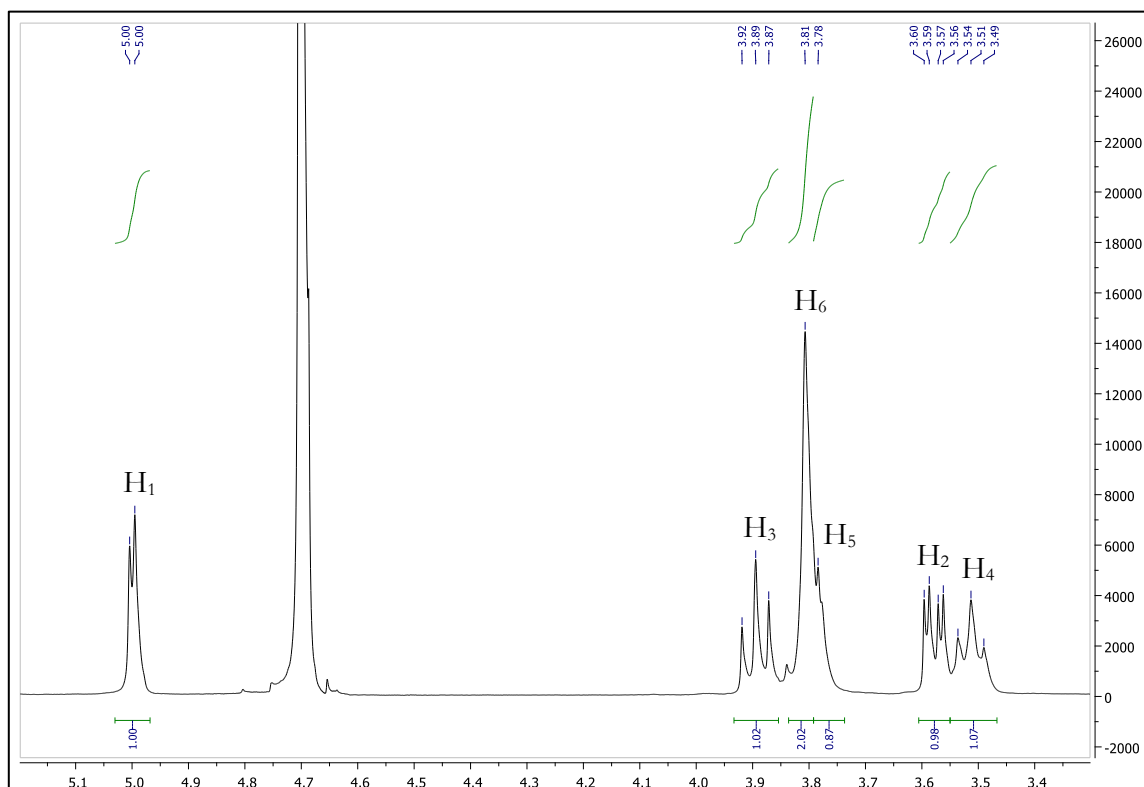


Figura 17 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de 5 mmol dm^{-3} β -CD em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a 298,15 K.

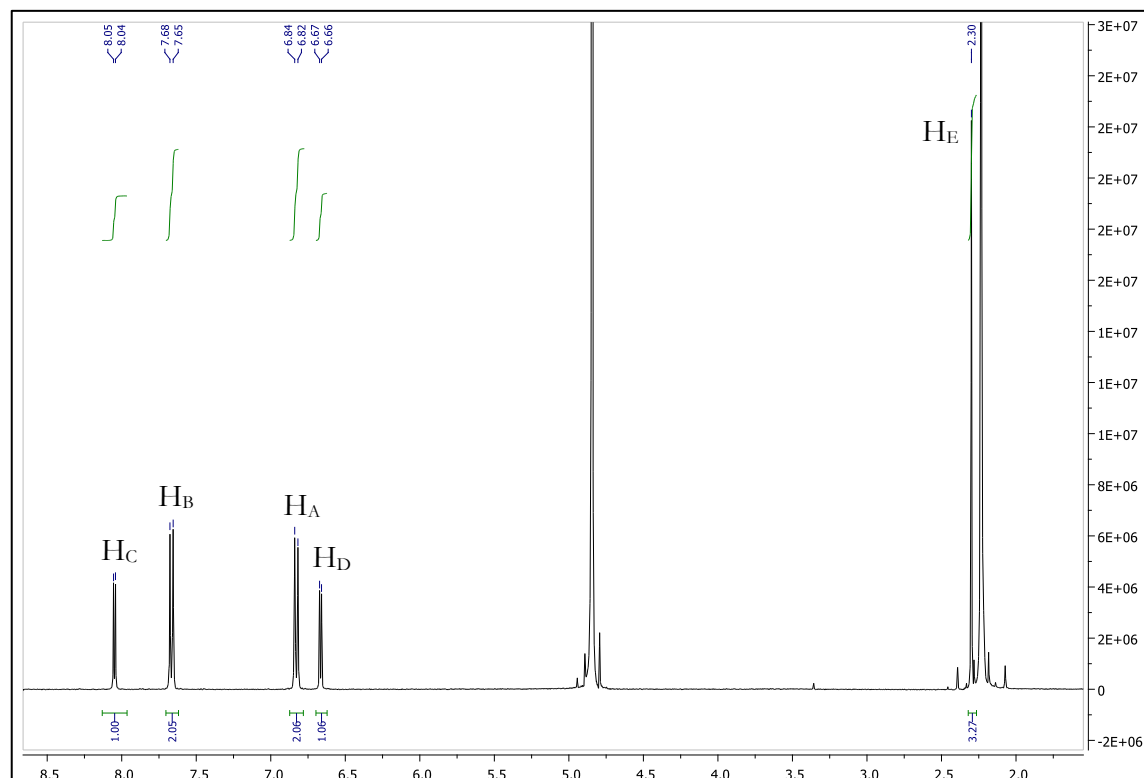


Figura 18 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de 5 mmol dm^{-3} NaSMR em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a 298,15 K.

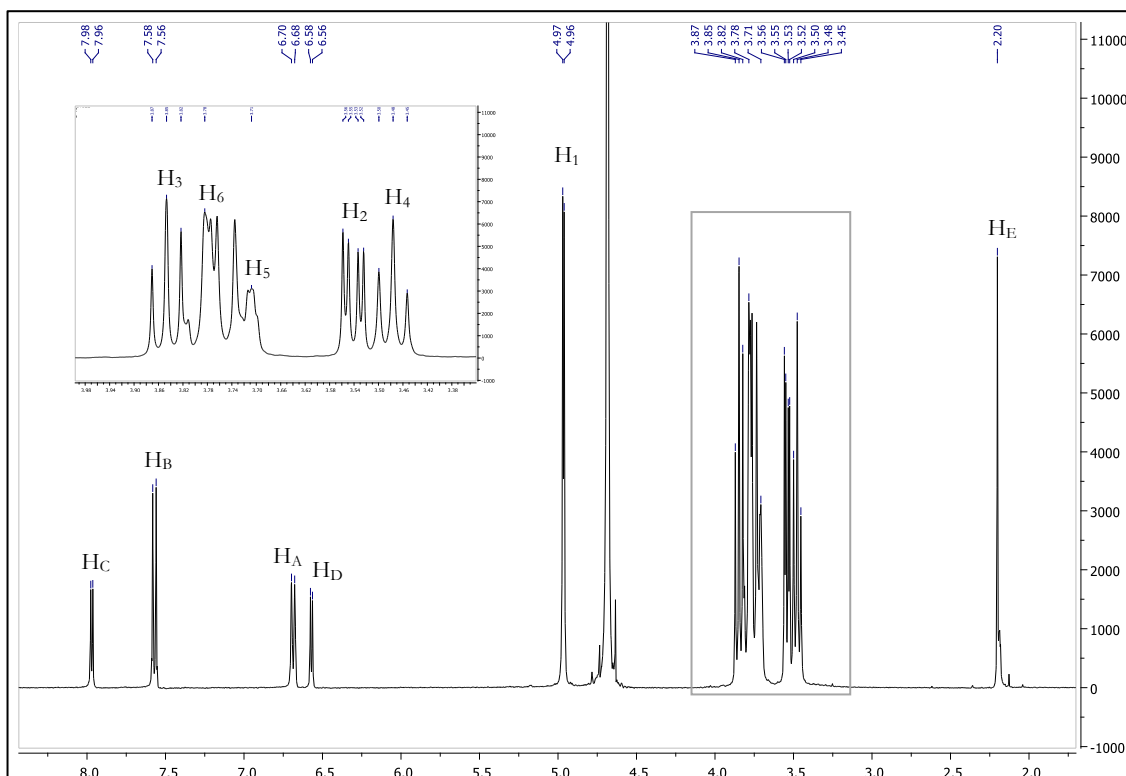


Figura 19 Espectro de ^1H -RMN de uma solução de $(5 : 5) \text{ mmol dm}^{-3} \beta\text{-CD/NaSMR}$ em D_2O ($\delta = 4,7 \text{ ppm}$) a $298,15 \text{ K}$.

Tabela 10 Parâmetros de ^1H -RMN da $\beta\text{-CD}$ na ausência e na presença de NaSMR a $298,15 \text{ K}$.

	$\beta\text{-CD}^{\text{a)}$	$\beta\text{-CD (+ NaSMR)}^{\text{b)}$	$\Delta \beta\text{-CD}^{\text{c)}$
$\delta(\text{H}_1) / \text{ppm}$	5,00	4,97	- 0,03
$\delta(\text{H}_2) / \text{ppm}$	3,58	3,54	- 0,04
$\delta(\text{H}_3) / \text{ppm}$	3,90	3,85	- 0,05
$\delta(\text{H}_4) / \text{ppm}$	3,51	3,48	- 0,03
$\delta(\text{H}_5) / \text{ppm}$	3,78	3,70	- 0,08
$\delta(\text{H}_6) / \text{ppm}$	3,81	3,78	- 0,03
J_1 / Hz	3,70	3,70	0

a) $5 \text{ mmol dm}^{-3} \beta\text{-CD}$.

b) $5 \text{ mmol dm}^{-3} \beta\text{-CD} + 5 \text{ mmol dm}^{-3} \text{NaSMR}$.

c) Diferença entre os parâmetros obtidos para a $\beta\text{-CD}$ na presença e na ausência de NaSMR, respectivamente.

Capítulo 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Tabela 11 Parâmetros de ^1H -RMN da NaSMR na ausência e na presença de β -CD a 298,15 K.

	NaSMR ^{a)}	NaSMR (+ β -CD) ^{b)}	Δ NaSMR ^{c)}
$\delta(\text{H}_A)$ / ppm	6,83	6,69	- 0,14
$\delta(\text{H}_B)$ / ppm	7,67	7,57	- 0,10
$\delta(\text{H}_C)$ / ppm	8,05	7,97	- 0,08
$\delta(\text{H}_D)$ / ppm	6,67	6,57	- 0,10
$\delta(\text{H}_E)$ / ppm	2,30	2,20	- 0,10
J_A / Hz	8,60	8,10	- 0,50
J_B / Hz	8,70	8,70	0
J_C / Hz	5,20	5,20	0
J_D / Hz	5,20	5,20	0

^{a)} 5 mmol dm⁻³ NaSMR.

^{b)} 5 mmol dm⁻³ NaSMR + 5 mmol dm⁻³ β -CD.

^{c)} Diferença entre os parâmetros obtidos para a NaSMR na presença e na ausência de β -CD, respetivamente.

Ao aumentar a razão $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}]$ verifica-se que ocorre um desvio significativo dos prótons H_3 e H_5 para campos mais altos. A variação deste desvio mostra-se mais abrupta para razões mais baixas e tende a diminuir à medida que se aumenta a $[\text{NaSMR}]$ em solução, indicando que os locais de interação na cavidade da β -CD vão ficando ocupados com entidades de NaSMR até atingir a sua saturação.

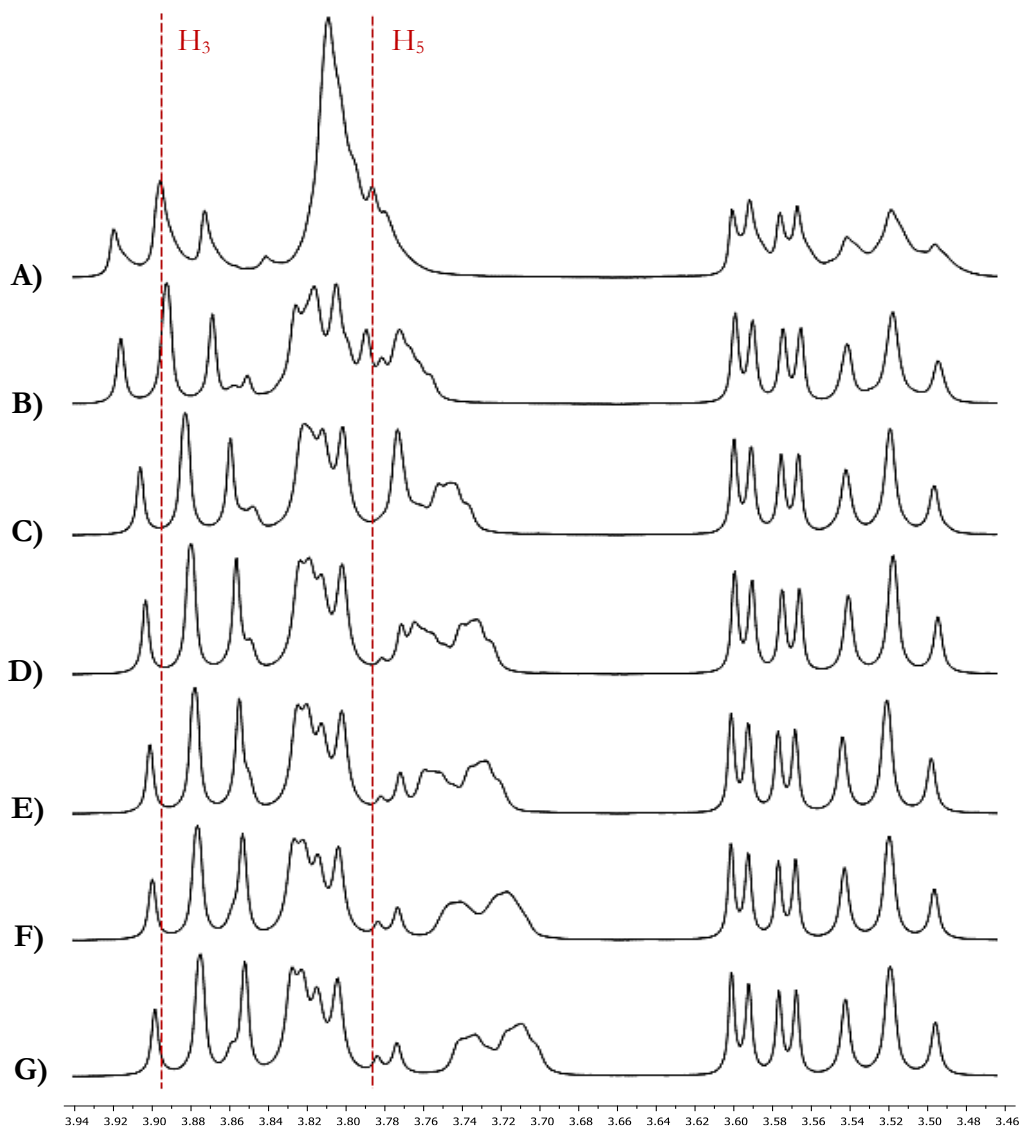


Figura 20 Expansão dos espectros de ^1H -RMN (3,46 a 3,94 ppm) das soluções em D_2O de **A)** $[\beta\text{-CD}] = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$; **B)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (3,0/5,0) = 0,6$; **C)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (5,0/5,0) = 1,0$; **D)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (7,5/5,0) = 1,5$; **E)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (10,0/5,0) = 2,0$; **F)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (12,5/5,0) = 2,5$; **G)** $[\text{NaSMR}]/[\beta\text{-CD}] (15,0/5,0) = 3,0$.

Uma análise mais profunda da interação entre a $\beta\text{-CD}$ e a NaSMR pode ser realizada de forma quantitativa através do ajuste destes desvios químicos à equação (4.4). Apesar de o H_5 mostrar um desvio mais acentuado do que o H_3 , os resultados obtidos para o primeiro são comprometidos pela sobreposição com o sinal do H_6 e pela alteração do perfil do sinal à medida que se aumenta a $[\text{NaSMR}]$, como mostra a figura 20. Contudo, para o H_3 foi possível convergir o ajuste não linear, encontrando-se representado na figura 21.

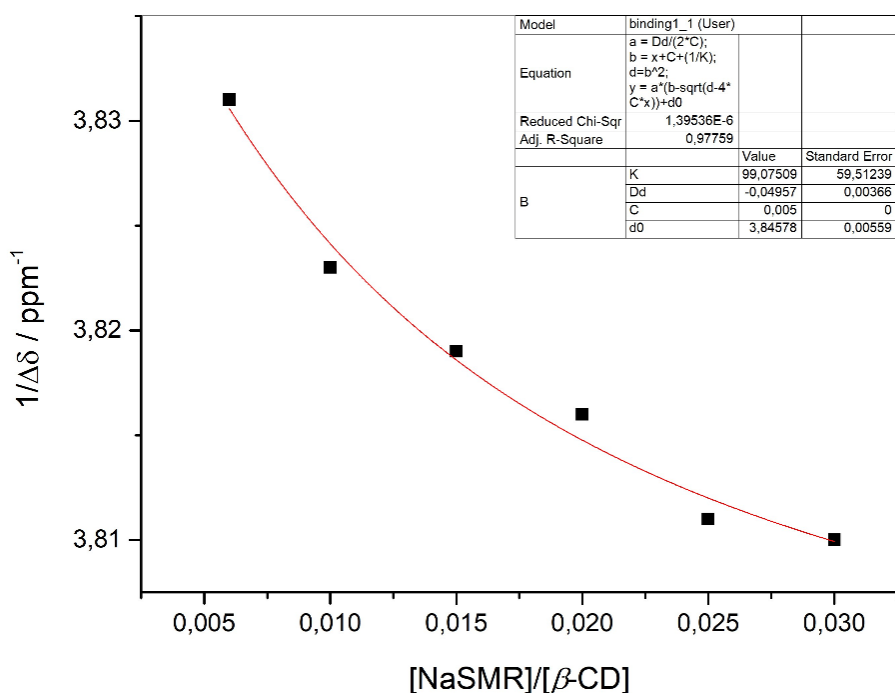


Figura 21 Ajuste não linear da equação (4.6) aos dados experimentais de H_3 obtidos por 1H -RMN na figura 20, com $R^2 = 0,978$.

O valor estimado a partir de 1H -RMN para a constante de associação de complexos de inclusão do tipo 1 : 1 (β -CD : NaSMR) foi de $99 \pm 60 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. É importante ter em conta que o desvio padrão de K tende a aumentar com o aumento do número de parâmetros de ajuste [121].

Estas alterações nos espectros de 1H -RMN de ambas as espécies quando passam a estar juntas em solução corroboram a formação de um complexo de inclusão e apontam para a incorporação de uma parte do anel A da NaSMR na cavidade hidrofóbica da β -CD. Uma das possíveis justificações para esta preferência poderia ser atribuída à maior estruturação da água na zona do anel B, atribuída à substituição do anel pirimidínico pelo grupo metilo, como mencionado nos estudos de difusão isotérmica. Na figura 22 encontra-se uma representação hipotética da geometria do complexo de inclusão entre a β -CD e a NaSMR, segundo os resultados obtidos por 1H -RMN.

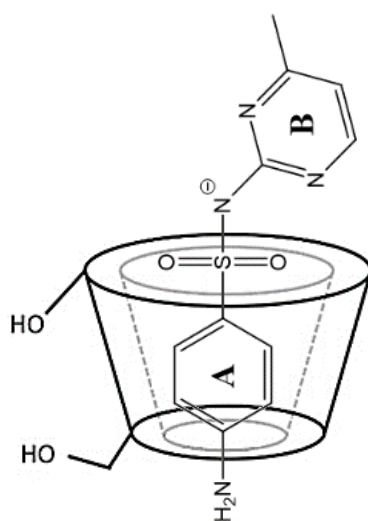


Figura 22 Representação hipotética de um complexo de inclusão entre a β -CD e a NaSMR segundo os resultados obtidos nos estudos de ^1H -RMN.

Capítulo 5

5. Calorimetria de Titulação Isotérmica

Uma avaliação mais profunda do mecanismo molecular envolvido na formação dos complexos de inclusão pode ser obtida através da caracterização e quantificação da energia envolvida nesse processo. Os parâmetros termodinâmicos refletem os vários tipos de forças que governam a ligação, nomeadamente os efeitos de entropia da absorção/libertação de moléculas de água e as contribuições entálpicas na formação de ligações [128].

A calorimetria é a única técnica que permite estudar diretamente o calor associado a um dado processo, o que a pressão constante é equivalente à variação da entalpia do processo. Estas medições podem ser feitas com mudança de temperatura (adiabático), por condução de calor ou por compensação de potência a temperatura constante (isotérmico), sendo este último o mais utilizado devido ao melhor tempo de resposta e maior precisão na determinação de pequenos calores de reação [129].

A técnica de ITC é utilizada para a obtenção direta das constantes de equilíbrio e entalpia de ligação resultantes da interação entre macromoléculas ou entre uma macromolécula e um analito de interesse. Consiste na medição exata do calor libertado/absorvido num processo sequencial de ligação, ou seja, numa titulação, a temperatura constante. Sendo o valor desta medição proporcional à interação entre as duas espécies na titulação é possível determinar simultaneamente a afinidade de ligação e a entalpia de ligação e, conseqüentemente, a entropia e energia livre, fornecendo uma caracterização termodinâmica completa da ligação entre a macromolécula e o analito numa só experiência [130]. As condições experimentais não são alteradas, pelo que os resultados obtidos são determinados nas condições estabelecidas, sem comprometer a estabilidade cinética ou termodinâmica da macromolécula pela mudança das condições experimentais [131].

O calor previsto, q_i , no passo i da titulação é calculado através da equação (5.1).

$$q_i = \Delta H (n_i - n(i - 1) (1 - \frac{V_i}{V_{\text{cel}}})) + q_{\text{dil}} \quad (5.1)$$

onde ΔH é a entalpia molar da interação, n_i é o número de moles de complexo ligado após a injeção i , V_i é o volume de injeção, V_{cel} é o volume da célula calorimétrica e q_{dil} é o calor de diluição.

Capítulo 5. Calorimetria de Titulação Isotérmica

Os parâmetros termodinâmicos podem ser uma ferramenta útil para definir a espontaneidade do processo de inclusão e o efeito da temperatura nos sistemas através das mudanças nos valores da variação da entalpia (ΔH) e da variação da energia livre de Gibbs (ΔG). A variação da entropia (ΔS) fornece informações sobre a troca de moléculas de água, dentro da cavidade do hospedeiro, por moléculas hóspedes durante a formação do complexo. O cálculo dos parâmetros termodinâmicos descritos pode ser realizado segundo a relação da equação (5.2).

$$\Delta G = - R T \ln(K) = \Delta H - T \Delta S \quad (5.2)$$

onde R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura (K).

Numa experiência de ITC o hospedeiro é geralmente colocado na célula de amostra, onde é titulado com uma molécula hóspede colocada na seringa. A afinidade de ligação é determinada pela medição direta da troca de calor com o ambiente. A extração dos parâmetros termodinâmicos dos dados calorimétricos depende do uso de ajuste da curva de mínimos quadrados não linear ao aplicar um modelo apropriado que descreve a interação em estudo. A forma da curva calorimétrica pode ser relacionada com a concentração da macromolécula, $[M]$, e K , pelo parâmetro c de Wiseman na equação (5.3).

$$c = n K [M] \quad (5.3)$$

onde n é o número de sítios por recetor M . A figura 23 mostra o efeito do parâmetro de Wiseman nas curvas calorimétricas. O parâmetro c de Wiseman é uma medida que avalia a eficiência da ligação entre dois componentes num sistema. Valores baixos de c indicam uma interação fraca ou ineficaz, enquanto valores altos de c indicam a formação de complexos supramoleculares estáveis.

Para valores de c mais altos a curva é claramente sigmoideal e permite a determinação da entalpia, constante de ligação e estequiometria da reação. No entanto, para valores de c mais baixos, a estequiometria de ligação deve ser corrigida, o que se deve à forte correlação entre ΔH° e n , o que torna difícil determinar ambos simultaneamente.

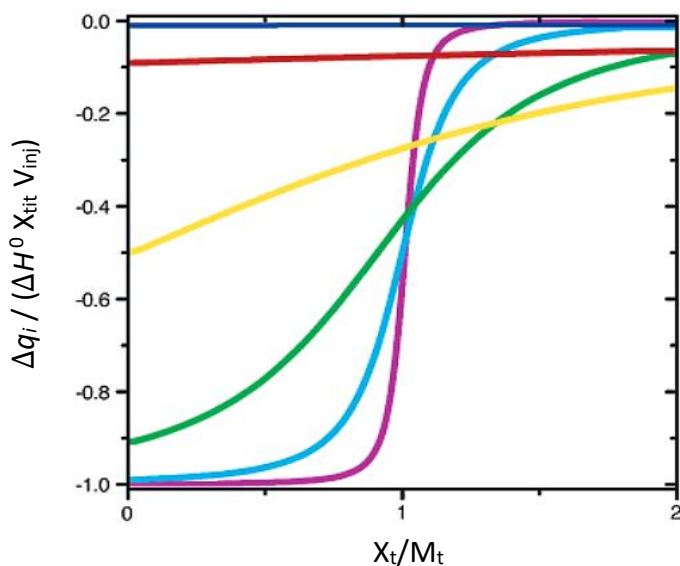


Figura 23 Representação tradicional da isotérmica de Wiseman, com o parâmetro c de Wiseman igual a: 1000 (—), 100 (—), 10 (—), 0,1 (—) e 0,01 (—). Adaptado de [132].

5.1. Interação entre CDs e NaSAs por ITC

Os termogramas obtidos para a diluição de 1 mmol dm^{-3} β -CD e NaSMR em água encontram-se apresentados na figura 24.A e 24.B, respectivamente, e o termograma referente à titulação de 5 mmol dm^{-3} β -CD (titulante) para 1 mmol dm^{-3} NaSMR (titulado) encontra-se na figura 25. Os resultados obtidos foram semelhantes para os restantes sistemas de NaSAs + CDs.

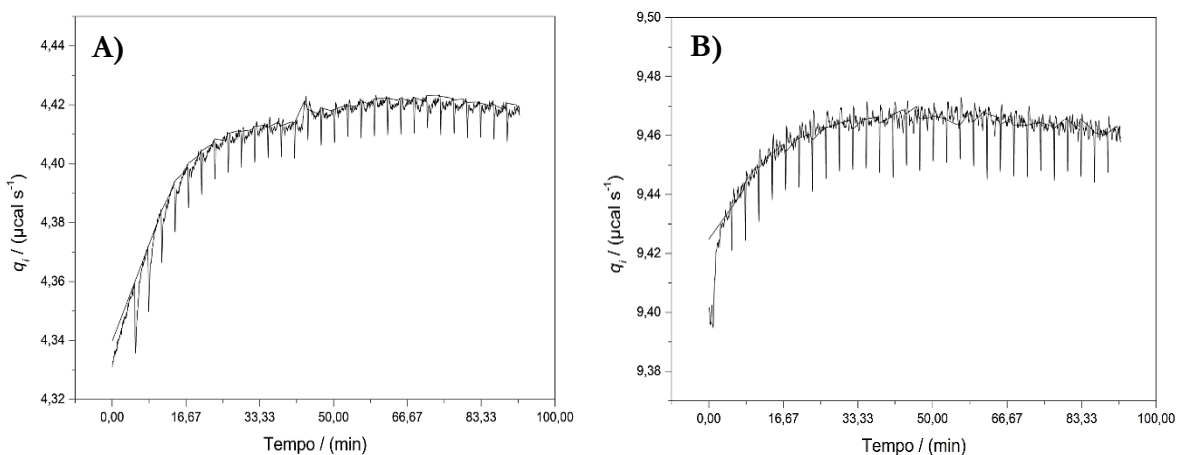


Figura 24 Termograma obtido através da diluição em água de **A)** 1 mmol dm^{-3} β -CD e **B)** 1 mmol dm^{-3} NaSMR.

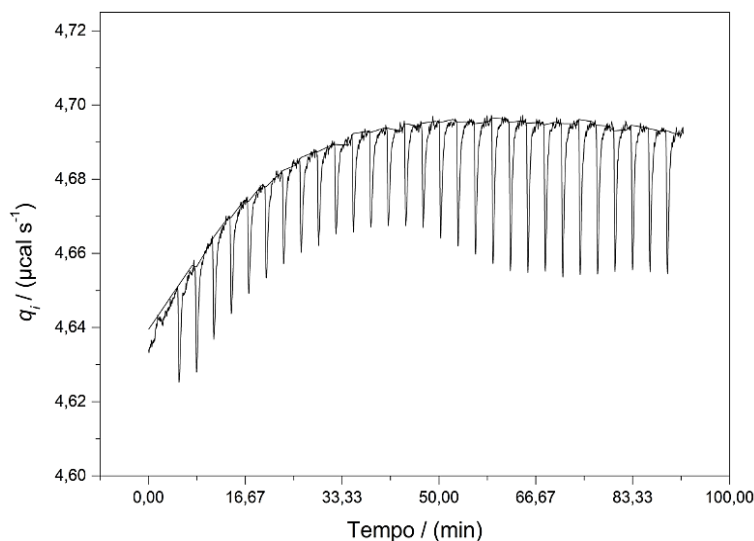


Figura 25 Termograma obtido através da titulação de 5 mmol dm^{-3} β -CD para 1 mmol dm^{-3} NaSMR.

Observa-se que a diluição da NaSMR em β -CD em água conduz a uma diminuição na potência fornecida pelo equipamento para manter o sistema à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o que indica um processo exotérmico. Contudo, nota-se que o calor registado na diluição das substâncias em água assemelha-se aqueles registados para as titulações entre NaSAs e CDs, não sendo possível detetar interação entre ambos através da técnica de ITC. De facto, esta técnica mostra-se complexa para determinar complexos com baixos valores do parâmetro c de Wiseman e, de acordo com Hazra e Kumar [133], a sensibilidade da técnica de ITC permite determinar constantes de ligação entre 10^2 e 10^8 mol dm^{-3} , o que está de acordo com as restantes técnicas, onde se determinaram constantes de associação para os sistemas NaSAs + CDs inferiores a 10^2 mol dm^{-3} . Foram testadas experiências com outra gama de concentrações (10 mmol dm^{-3} CD e 1 mmol dm^{-3} NaSA) e valores de temperatura diferentes (10 e $40 \text{ }^\circ\text{C}$), mas os resultados permaneceram iguais. Estes fatores podem indicar que a interação entre as espécies é fraca, o que pode explicar o porquê da ITC não estar a detetar uma mudança de calor significativa durante a titulação. A quantidade de complexo formada parece ser relativamente pequena em comparação com a concentração das moléculas não complexadas e, quando essas interações são de baixa estabilidade, significa que elas são facilmente quebradas ou formadas em resposta a pequenas mudanças nas condições experimentais, o que torna difícil caracterizar as interações por serem transitórias, especialmente em técnicas como a ITC que requerem uma deteção sensível de mudanças de energia.

Capítulo 6

6. Nanoesponjas de Ciclodextrinas

6.1. Síntese e Caracterização das Nanoesponjas de Ciclodextrinas

O procedimento experimental da síntese das nanoesponjas (NSs) de ciclodextrinas (CDs) encontra-se descrito no capítulo da secção experimental (subcapítulo 8.3.5) e as etapas sintéticas estão representadas no esquema da figura 26.

De acordo com os resultados descritos nos capítulos anteriores, e tendo em conta que coeficientes de difusão ternários mais elevados promovem uma transferência de massa mais rápida dos contaminantes para o interior do material adsorvente, resultando em menores tempos de contacto e maior eficiência de remoção, a escolha da β -CD e γ -CD foi considerada para a síntese das NSs. A seleção da β -CD em detrimento da γ -CD deveu-se à incapacidade de reticular a γ -CD.

Em suma, a substituição dos grupos hidroxilo na posição C₆ da β -CD por iodo foi realizada com I₂, DMF como solvente e PH₃P como catalisador, formando I-CD (iodação). De seguida, procedeu-se à aaminação através da substituição nucleofílica dos átomos de iodo no C₆ da I-CD pela diamina, resultando na formação de am₆-CD (aminação), sendo efetuadas lavagens com éter dietílico para remover o excesso de diamina que não reagiu. A adição de am₆-CD a I-CD na proporção 1 : 1, através de uma nova substituição nucleofílica dos grupos amina livres da am₆-CD na posição C₆ da I-CD, levou à formação da NS CD-am₆-CD (polimerização). Já a adição de am₆-CD a GLT na proporção 1 : 7, através da formação de iminas a partir do ataque nucleofílico dos grupos amina livres da am₆-CD aos grupos aldeído do GLT, levou à formação da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD (polimerização). A redução dos grupos imina da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD com NaBH₄ levou à formação da NS CD-am₆-GLT-am₆-CD (redução).

A eficiência de substituição da I-CD e am₆-CD na síntese das NSs foi determinada por ¹H-RMN, cujos espetros se encontram representados nas figuras 27 e 28, respetivamente. Na etapa de iodação verifica-se que no espetro de ¹H-RMN da I-CD apenas são detetados protões de dois grupos hidroxilo, ao contrário da β -CD, onde existem três grupos hidroxilo em cada unidade glicosídica, o que comprova a substituição dos grupos hidroxilo na posição C₆ da β -CD pelo iodo. Relativamente à etapa de aaminação, a integração

do pico com desvio químico para campo mais alto no espectro de ^1H -RMN da $\text{am}_6\text{-CD}$ deveria ser igual a 8 H, mas registaram-se integrações de aproximadamente 10 H, o que indica que não existe um grande excesso de diamina após as lavagens com éter dietílico. O excesso de diamina pode dificultar as ligações cruzadas entre moléculas de $\beta\text{-CD}$ e diamina e levar à formação de uma estrutura polimérica mais frágil e menos resistente. Além disso, os espaços na estrutura reticulada que deveriam estar disponíveis para interagir com os antibióticos são ocupados e passam a existir regiões na estrutura do polímero com menor afinidade para interagir com estas substâncias. Contudo, o pequeno excesso de diamina observado não é significativo para ser considerado um fator limitante das NSs enquanto material adsorvente de NaSAs em soluções aquosas.

A estrutura química de $\text{am}_6\text{-CD}$, $\text{CD-am}_6\text{-CD}$ e $\text{CD-am}_6\text{=GLT=am}_6\text{-CD}$ foi confirmada por FTIR-ATR e os espectros obtidos estão na figura 29. Todos os espectros apresentam os picos característicos da $\beta\text{-CD}$, correspondentes à vibração de alongação dos grupos -O-H a 3300 cm^{-1} , das ligações -C-O- a 1087 cm^{-1} e das ligações glicosídicas $\alpha\text{-1}\rightarrow\text{4}$ a 1029 cm^{-1} . As bandas típicas das vibrações de alongação assimétrica e simétrica das cadeias hidrocarbonadas são observadas a 2853 e 2923 cm^{-1} . Em relação ao reticulante é possível confirmar a sua presença na banda a 1455 cm^{-1} , associada à deformação angular simétrica em tesoura dos grupos -CH_2 das cadeias alifáticas. Esta apenas se observa de forma nítida para o precursor $\text{am}_6\text{-CD}$. A presença dos grupos amina primária e secundária é confirmada nos espectros de $\text{am}_6\text{-CD}$, NS $\text{CD-am}_6\text{-CD}$ e NS $\text{CD-am}_6\text{=GLT=am}_6\text{-CD}$, na banda da região de 1650 cm^{-1} , associada às suas vibrações de deformação. A vibração de alongação das ligações -C=N das iminas presentes na NS $\text{CD-am}_6\text{=GLT=am}_6\text{-CD}$ também se observa na região de 1650 cm^{-1} , pelo que a banda é um pouco mais intensa no espectro de infravermelho desta NS do que no da NS $\text{CD-am}_6\text{-CD}$. No caso da NS $\text{CD-am}_6\text{=GLT=am}_6\text{-CD}$ observa-se uma diminuição da intensidade da banda a 3300 cm^{-1} , o que se pode dever à formação de ligações de hidrogénio intramoleculares entre os grupos imina e amina, as quais criam uma força adicional que pode restringir os movimentos vibracionais desses grupos e levar a uma diminuição da energia associada à respetiva banda. Apesar de tudo, as bandas correspondentes à alongação de -C-I a 747 cm^{-1} e deformação a 1150 cm^{-1} não desaparecem nos espectros de infravermelho, apenas para o caso da NS $\text{CD-am}_6\text{=GLT=am}_6\text{-CD}$, indicando que a substituição nucleofílica no precursor I-CD não ocorreu de forma total para as sete unidades glicosídicas e as NSs apresentam átomos de iodo em alguns dos átomos de carbono C_6 .

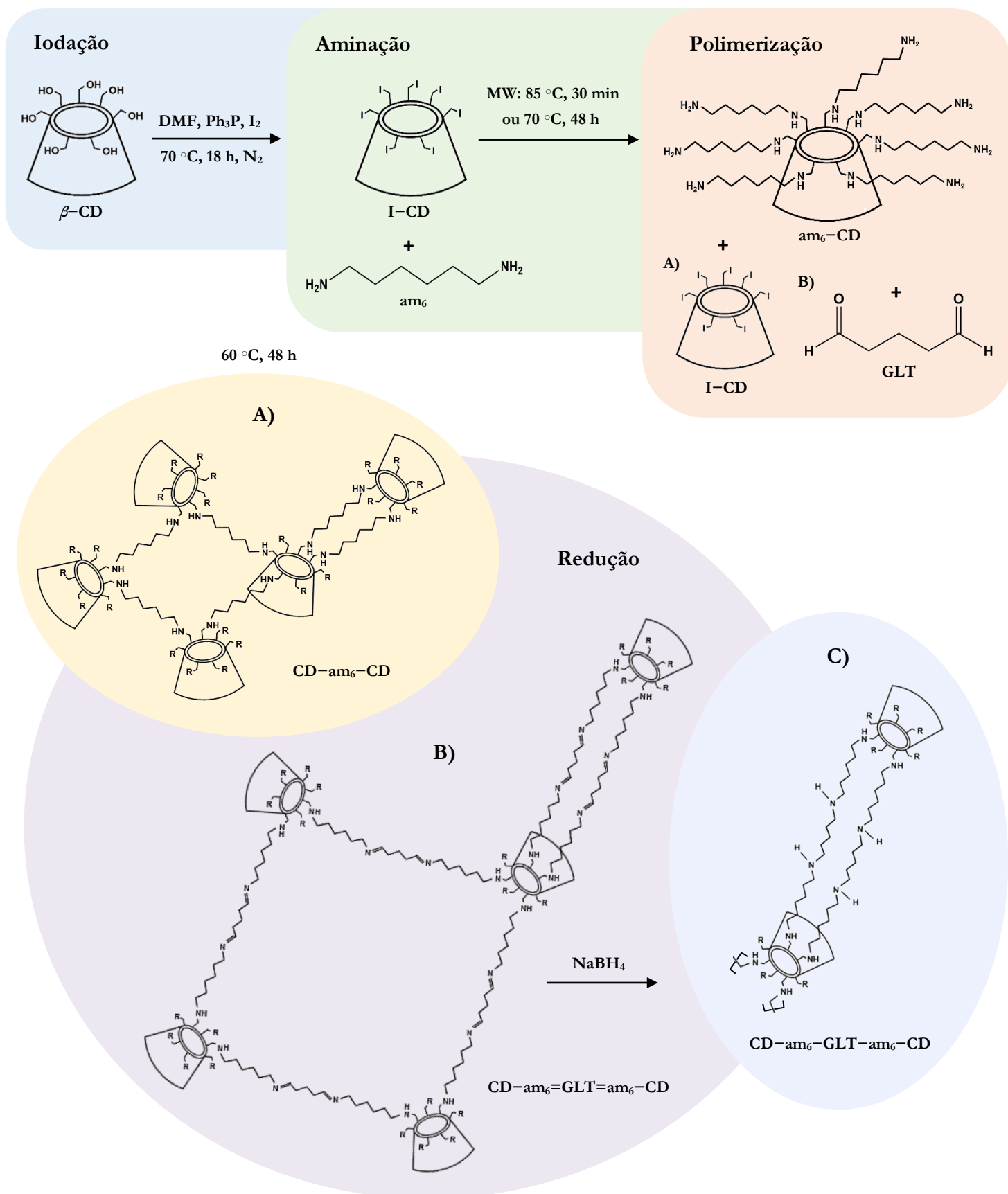


Figura 26 Esquema sintético das NSs **A)** CD-am₆-CD, **B)** CD-am₆=GLT=am₆-CD e **C)** CD-am₆-GLT-am₆-CD.

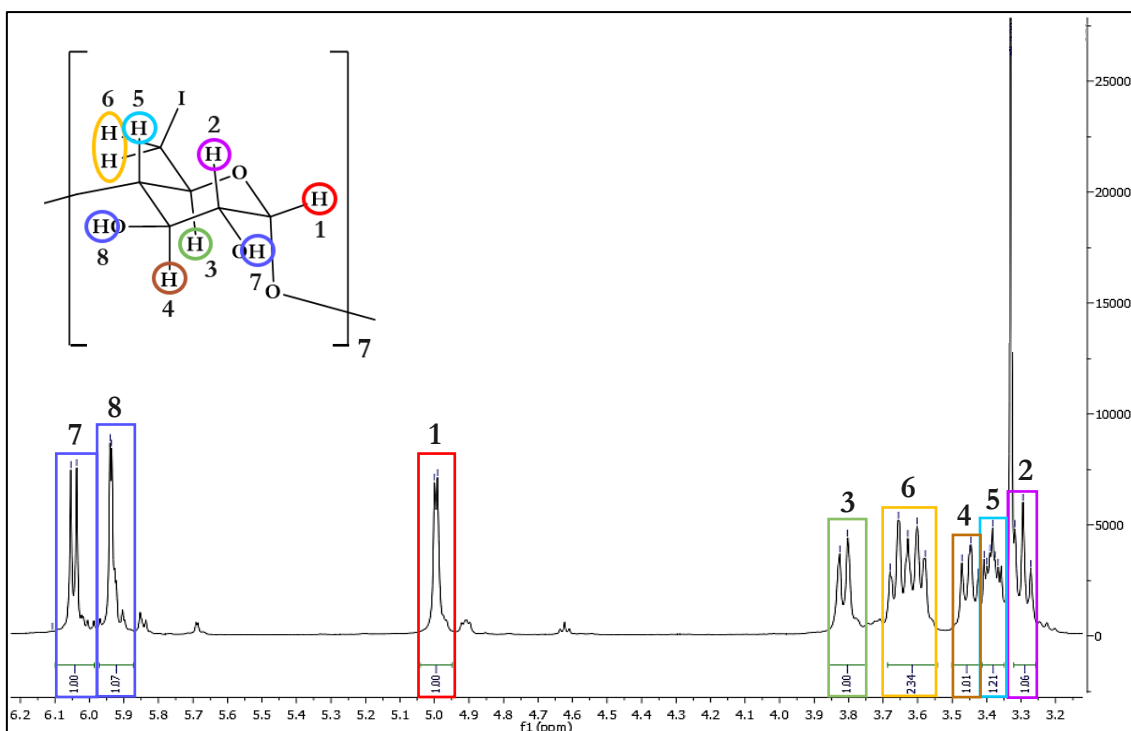


Figura 27 Espectro de ^1H -RMN de α -CD em DMSO ($\delta = 2,5$ ppm) a 298,15 K.

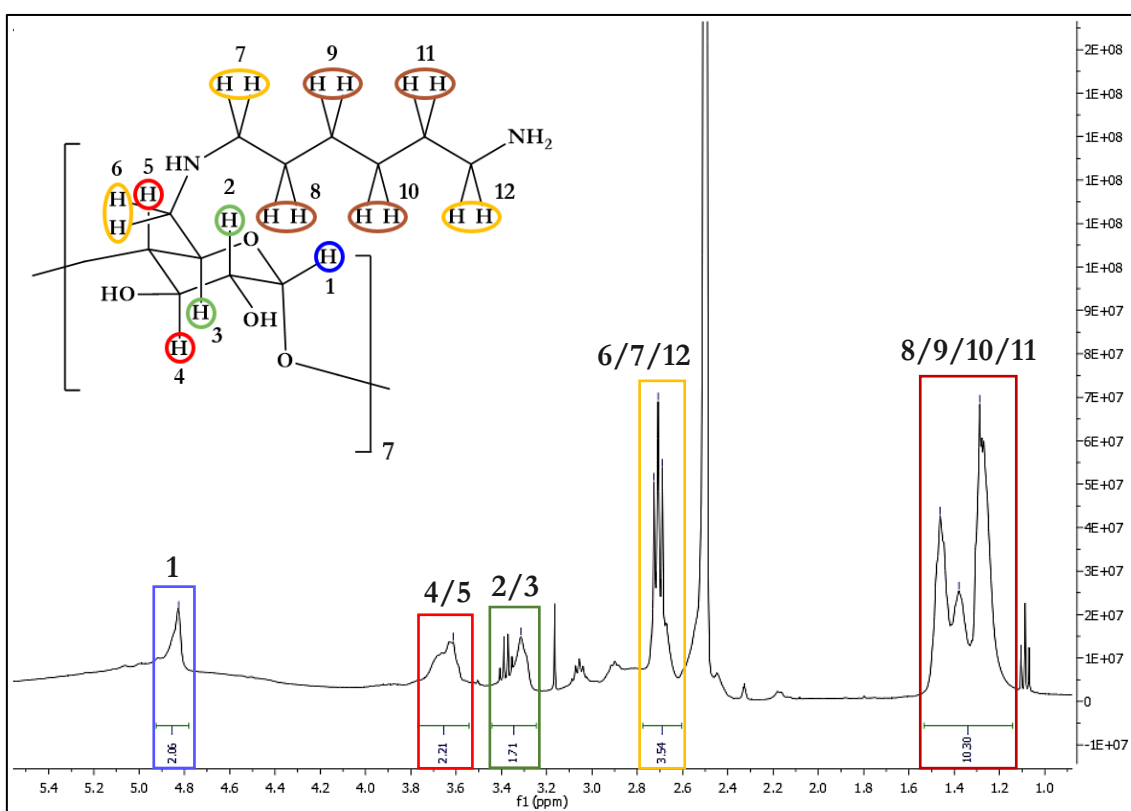


Figura 28 Espectro de ^1H -RMN de am_6 -CD em DMSO ($\delta = 2,5$ ppm) a 298,15 K.

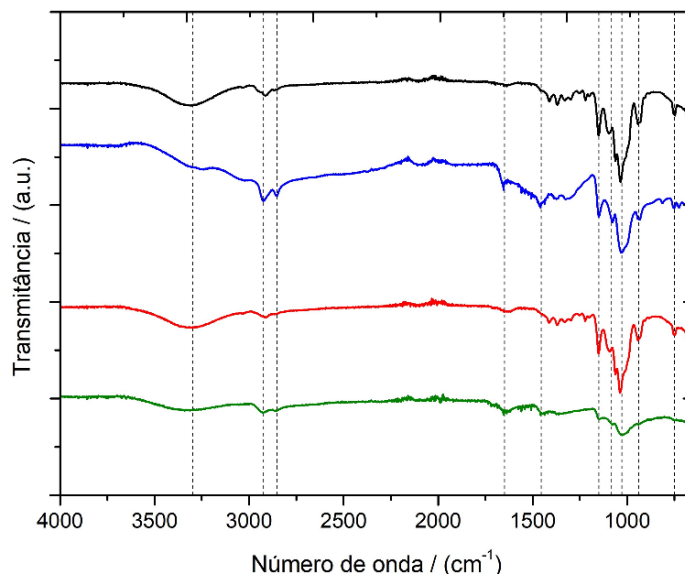


Figura 29 Espectros de infravermelho de I-CD (—), am₆-CD (—), NS CD-am₆-CD (—) e NS CD-am₆-GLT-am₆-CD (—).

A estrutura da NS CD-am₆-GLT-am₆-CD não foi confirmada por FTIR-ATR, mas observou-se que, após a redução da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD para a NS CD-am₆-GLT-am₆-CD, ocorreu uma mudança da cor das NSs, passando de vermelho para branco (figura 30), o que revela alterações na estrutura eletrônica e nas propriedades dos polímeros envolvidos. A NS CD-am₆=GLT=am₆-CD possui grupos imina na sua estrutura com elétrons π que podem absorver energia na zona do visível, ao contrário da NS CD-am₆-GLT-am₆-CD, que não apresenta esses grupos e, portanto, não absorve luz na zona do visível.

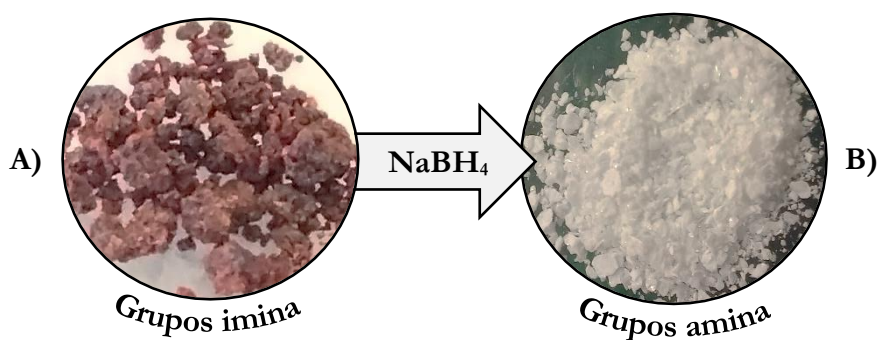


Figura 30 Fotografias das NSs **A)** CD-am₆=GLT=am₆-CD e **B)** CD-am₆-GLT-am₆-CD.

A estabilidade térmica das NSs foi avaliada por TGA. Os termogramas e dTGs das NSs estão representados na figura 31 e as perdas de massa associadas encontram-se descritas na tabela 12. Observa-se uma perda de massa inicial na faixa de temperatura de 50 a 200 °C, associada à evaporação de água cristalizada no interior das cavidades das β -CDs e

desidratação dos grupos $-OH$ da superfície externa, sendo que para a NS CD- α -CD existe uma perda de massa de 4% sem picos dTG associados, pelo facto da perda de massa ser constante, mas para as NSs CD- α -GLT- α -CD e CD- α -GLT- α -CD a perda de massa ocorre de uma forma mais abrupta, pelo que se observam variações na dTG com uma perda de massa cumulativa de 5% para ambos. Nos termogramas das NSs observa-se uma variação de perda de massa mais suave para a NS CD- α -CD comparativamente às restantes, o que se pode dever à textura das amostras submetidas a aquecimento, pois esta consiste num pó e as outras foram obtidas em forma de grãos com uma textura menos homogénea, provocando consequentemente um aquecimento menos uniforme.

Após os 200 °C ocorrem as maiores perdas de massa, correspondentes às etapas de degradação. Verifica-se uma estabilidade térmica relativamente elevada para ambos os polímeros e, comparativamente ao comportamento térmico da β -CD, que apresenta uma $T_{m\acute{a}x} = 312$ °C com uma perda de massa associada de 84 % [134], confirma-se a ocorrência da degradação para temperaturas mais baixas no caso da NS CD- α -CD, a 216 °C, para temperaturas semelhantes no caso da NS CD- α -GLT- α -CD, a 310 °C e para temperaturas ligeiramente mais altas no caso da CD- α -GLT- α -CD, 325 °C. Estes resultados sugerem uma estabilidade térmica mais reduzida para a NS CD- α -CD devido a um enfraquecimento e a uma diminuição do número de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares na estrutura das β -CDs quando se efetua a reticulação. Já para as NSs CD- α -GLT- α -CD e CD- α -GLT- α -CD observa-se uma estabilidade térmica semelhante ou aprimorada, respetivamente, que pode estar associada a um melhor empacotamento intermolecular das cadeias alquílicas e, consequentemente, à formação de uma estrutura altamente reticulada. O facto de apresentar um maior comprimento das cadeias entre CDs também justifica a maior temperatura de fusão.

No caso das NSs CD- α -GLT- α -CD e CD- α -GLT- α -CD observa-se um comportamento térmico semelhante com três e duas etapas de degradação, respetivamente. A $T_{m\acute{a}x}(1)$ pode estar associada a um primeiro processo de fusão da β -CD, a $T_{m\acute{a}x}(2)$ está relacionada com a quebra da ligação da amina secundária na posição C_6 e a $T_{m\acute{a}x}(3)$ pode dever-se à quebra da ligação dupla da imina.

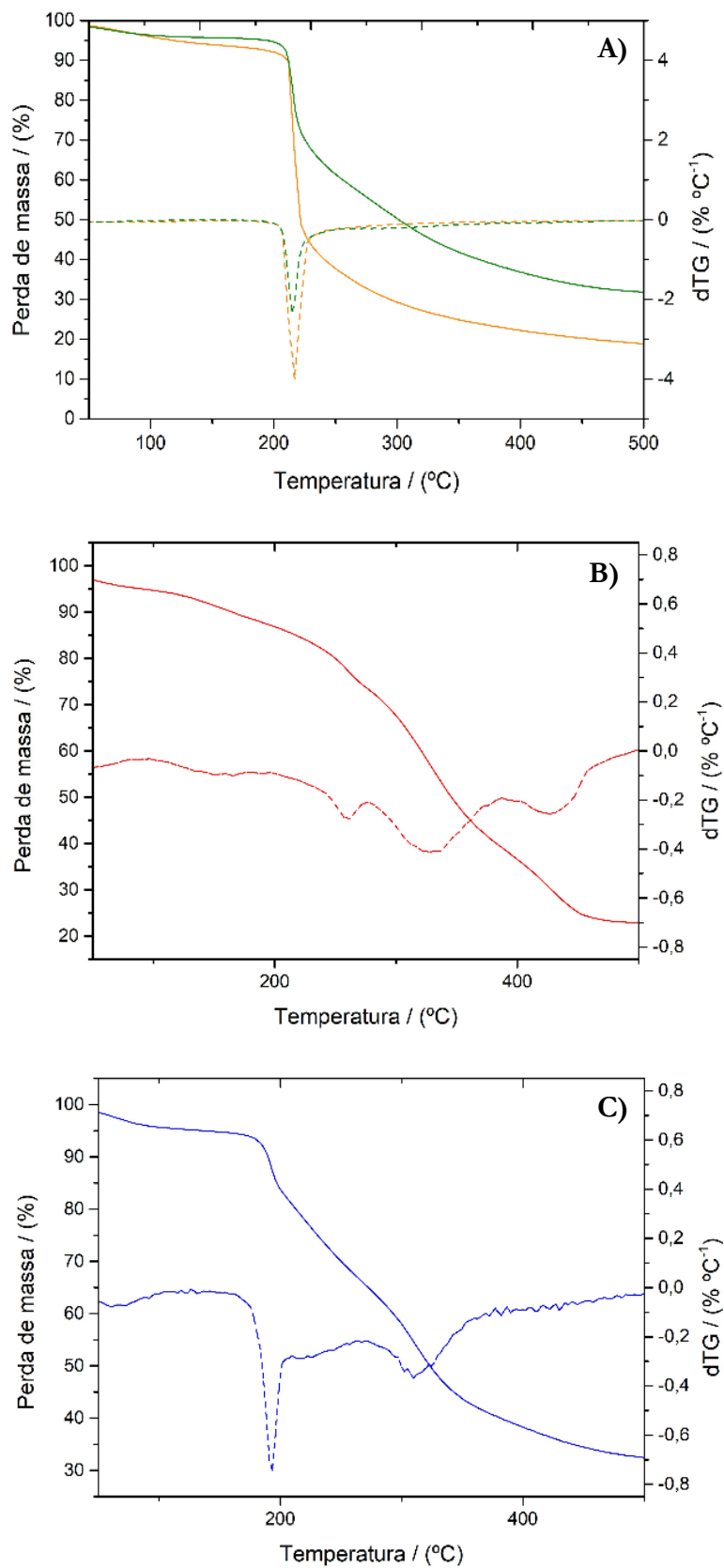


Figura 31 Termogramas (linha contínua) e respectivos dTG (linha tracejada) das NSs **A)** CD- α -CD sintetizada por aquecimento com micro-ondas (—) e CD- α -CD sintetizada por aquecimento convencional (—), **B)** CD- α -GLT- α -CD (—) e **C)** CD- α -GLT- α -CD (—).

Tabela 12 Parâmetros obtidos por TGA para as NS A (NSs CD- α -CD sintetizada com aquecimento por micro-ondas), NS A' (NSs CD- α -CD sintetizada com aquecimento convencional), NS B (CD- α -GLT= α -CD) e NS C (CD- α -GLT- α -CD).

	NS A (micro-ondas)		NS A' (convencional)		NS B		NS C	
	T _{máx} / (°C)	Perda de massa / (%)	T _{máx} / (°C)	Perda de massa / (%)	T _{máx} / (°C)	Perda de massa / (%)	T _{máx} / (°C)	Perda de massa / (%)
Desidratação	–	4	–	4	50	5	61	5
Degradação	216	32	216	54	260	14	193	13
	–	–	–	–	325	34	310	23
	–	–	–	–	427	15	–	–

Relativamente à NS CD- α -CD apenas se observa um único pico de degradação. Obtiveram-se dois termogramas para duas amostras da NS CD- α -CD com o intuito de avaliar a importância do método de aquecimento na segunda etapa da síntese das NSs: micro-ondas ou método convencional. Verificou-se que a T_{máx} ocorre a 216 °C para ambas as amostras, indicando que a composição química da NS não varia com o método de aquecimento escolhido. Contudo, verifica-se uma maior percentagem de degradação para a NS CD- α -CD que foi submetida a aquecimento convencional (54%) do que para aquela que foi submetida a aquecimento por micro-ondas (32%). Estes resultados indicam que o aquecimento convencional, durante 48 h, provoca uma maior degradação da NS do que quando esta é submetida a aquecimento por micro-ondas, durante 30 min, podendo causar alterações na estrutura da NS e até mesmo na sua cor, pelo que se observa uma cor mais escura para a NS sintetizada por aquecimento convencional (figura 32). Além disso, o aquecimento por micro-ondas pode fornecer uma distribuição mais uniforme de calor dentro do sistema reacional, reduzindo os gradientes de temperatura e minimizando o superaquecimento, face ao aquecimento convencional por correntes de condução e convecção, que leva a transformações não uniformes, pela existência de gradientes térmicos. Deste modo, a utilização de micro-ondas como fonte de aquecimento pode contribuir para a preservação das características da NS.

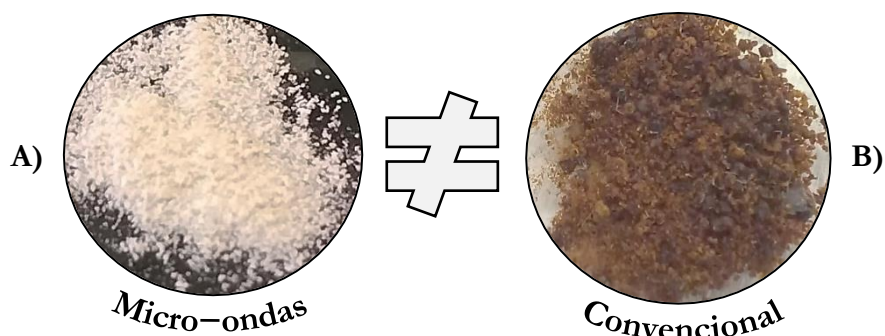


Figura 32 Fotografias das NSs sintetizadas por diferentes fontes de aquecimento: **A)** Micro-ondas; **B)** Convencional.

6.2. Ensaio de Adsorção das Nanoesponjas de Ciclodextrinas

Os fenómenos de adsorção são reversíveis e podem ser descritos por equações de equilíbrio. As condições experimentais para os ensaios de adsorção consideraram três fatores: concentração de antibiótico, quantidade de adsorvente e volume de solução. A sua influência na quantidade de antibiótico adsorvida por grama de adsorvente, q_e , é determinada através da expressão (6.1).

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} V \quad (6.1)$$

onde q_e (mg g^{-1}) é a quantidade de adsorvato capturada por unidade de massa de adsorvente, C_0 e C_e (mg L^{-1}) são a concentração de antibiótico no estado inicial e de equilíbrio, respetivamente, m (g) é a massa do adsorvente e V (L) o volume da solução.

A capacidade de adsorção é avaliada pela eficiência de remoção, Q , calculada através da formula (6.2).

$$Q = \left(\frac{C_0 - C_e}{m} \right) \times 100 \quad (6.2)$$

A compreensão do mecanismos de adsorção pode ser estudada a partir da construção de isotérmicas de sorção, as quais refletem um processo dinâmico atingido quando a relação entre q_e e C_e se mantém constante. Os valores experimentais de q_e podem ser ajustados em função de C_e a partir de vários modelos matemáticos, entre os quais os modelos de isotérmicas de sorção de Langmuir e Freundlich.

A equação de Langmuir é descrita pela equação empírica (6.3), que descreve a distribuição de equilíbrio do adsorvato na interface entre a fase sólida e a fase líquida.

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (6.3)$$

onde K_L ($L \text{ mg}^{-1}$) corresponde à constante de equilíbrio relacionada com os processos de sorção e dessorção. Este modelo é geralmente aplicado a processos de adsorção em monocamada, indicando a presença de locais homogêneos na superfície do adsorvente, ou seja, idênticos e energeticamente equivalentes. Deste modo, a quantidade adsorvida aumentará com o aumento da concentração até se atingir o patamar de equilíbrio que resulta da saturação dos locais ativos no adsorvente devido à formação da monocamada, atingindo-se a capacidade máxima de adsorção, q_m (mg g^{-1}), que traduz a quantidade de adsorvato necessária para formar a monocamada, uma vez que cada local no adsorvente só pode ser ocupado por uma espécie, não sendo possível ocorrer nenhuma adsorção adicional neste local.

A isotérmica de Freundlich é descrita pela equação empírica (6.4), onde K_F ($\text{mg}^{1-1/n_F} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n_F}$) é a constante de Freundlich, relacionada com a capacidade de adsorção do adsorvente, e n_F é o fator de heterogeneidade da superfície do polímero, a qual será mais heterogênea com a aproximação do fator a 0. Por sua vez, quando $n_F < 1$ ter-se-á um mecanismo de adsorção cooperativo, ou seja, em multicamadas de adsorvato, indicativo de processos de adsorção desfavoráveis. Já para $n_F > 1$, a sorção é afetada predominantemente por quimissorção, referente a processos de adsorção favoráveis.

$$q_e = K_F C_e^{1/n_F} \quad (6.4)$$

De seguida são descritos os ensaios de adsorção entre as NSs de CDs sintetizadas e caracterizadas previamente (NS CD-am₆-CD, NS CD-am₆=GLT=am₆-CD e NS CD-am₆-GLT-am₆-CD) e as soluções aquosas de NaSAs (NaSD, NaSMR e NaSMT).

As curvas de calibração da NaSD, NaSMR e NaSMT em água estão representadas nas figuras 33, 34 e 35, respetivamente, e os parâmetros estatísticos encontram-se nas tabelas 13, 14 e 15, nas quais se inclui o declive da reta de ajuste (b_1), o seu erro padrão (σ), os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) e os coeficientes de determinação (R^2).

Foram efetuados ensaios preliminares de adsorção através da dispersão de 1 mg de NS em 5, 2 e 1 mL de solução aquosa de NaSA, com razões sólido/líquido (S/L) de 0,2, 0,5 e 1,0 mg mL^{-1} , respetivamente. As amostras foram incubadas a 120 rpm e 25 °C, durante 24 h, com o objetivo de avaliar o efeito da razão sólido/líquido nas eficiências, Q, e capacidades de adsorção, q_e . Os resultados obtidos estão representados na figura 36.

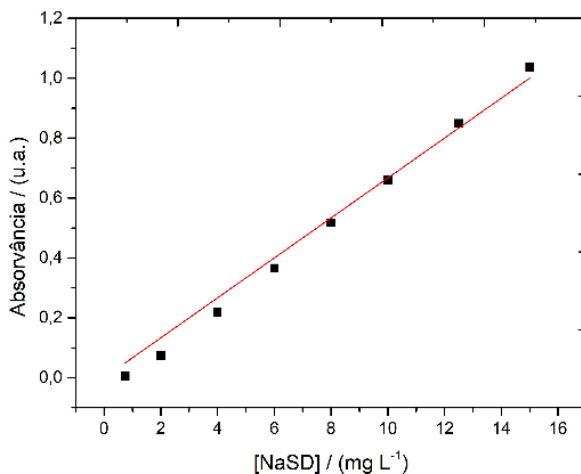


Figura 33 Curva de calibração de NaSD em água obtida por Uv-vis a 260 nm.

Tabela 13 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.

λ / (nm)	b_1 ($\sigma(b_1)$) / ($L\ mg^{-1}$)	R^2	LOD / ($mg\ L^{-1}$)	LOQ / ($mg\ L^{-1}$)	Gama Analítica / ($mg\ L^{-1}$)
260	0,0667 (0,0016)	0,9954	0,9624	1,0145	0,75 – 15

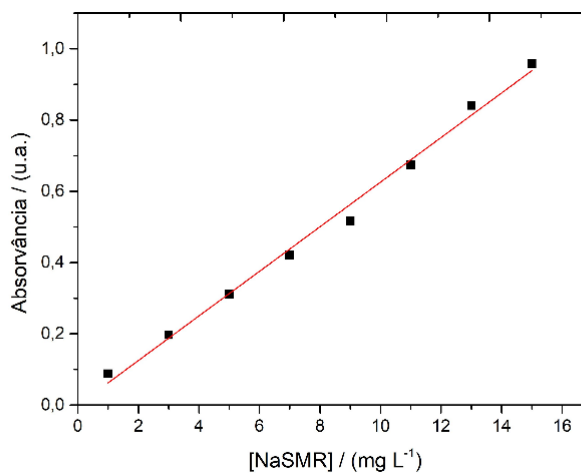


Figura 34 Curva de calibração de NaSMR em água obtida por Uv-vis a 260 nm.

Tabela 14 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.

λ / (nm)	b_1 ($\sigma(b_1)$) / ($L\ mg^{-1}$)	R^2	LOD / ($mg\ L^{-1}$)	LOQ / ($mg\ L^{-1}$)	Gama Analítica / ($mg\ L^{-1}$)
258	0,0626 (0,0010)	0,9981	0,0447	0,1058	1 – 15

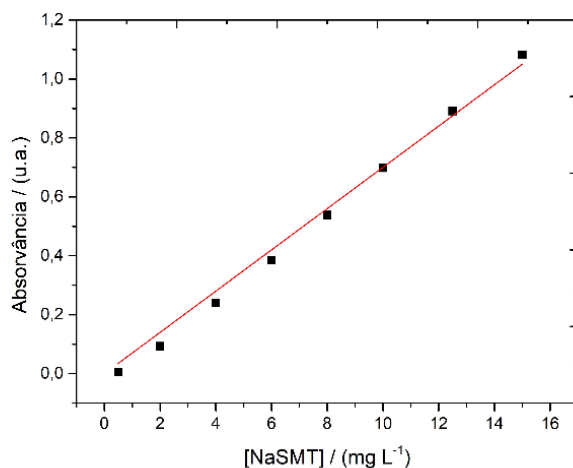


Figura 35 Curva de calibração de NaSMT em água obtida por Uv-vis a 260 nm.

Tabela 15 Parâmetros estatísticos da curva de calibração de NaSD em água.

λ / (nm)	b_1 ($\sigma(b_1)$) / (L mg ⁻¹)	R^2	LOD / (mg L ⁻¹)	LOQ / (mg L ⁻¹)	Gama Analítica / (mg L ⁻¹)
261	0,0700 (0,0013)	0,9971	0,7540	0,8048	0,5 – 15

A partir dos dados obtidos é possível concluir acerca de uma tendência semelhante para as três NSs, uma vez que as eficiências de adsorção aumentam com o aumento sucessivo da razão S/L, 0,2 mg mL⁻¹ a 1,0 mg mL⁻¹. No caso da NS CD-am₆-CD as percentagens variam desde 5,0% a 28,7%, aumentando para a NS CD-am₆=GLT-am₆-CD, de 9,7% a 49,9%, e crescendo ainda mais para a NS CD-am₆-GLT-am₆-CD, de 6,7% a 66,1%. No entanto, entre as mesmas razões sólido/líquido, observa-se uma diminuição contínua das capacidades de adsorção de todas as NSs, entre 2,1 mg mL⁻¹ e 0,2 mg mL⁻¹ para a NS CD-am₆-CD, 14,9 mg mL⁻¹ e 1,8 mg mL⁻¹ para a NS CD-am₆=GLT-am₆-CD e 13,0 mg mL⁻¹ e 1,2 mg mL⁻¹ para a NS CD-am₆-GLT-am₆-CD. Deste modo, o aumento da razão S/L levou a um aumento das eficiências de remoção, mas provocou uma diminuição nas capacidades de adsorção das NSs.

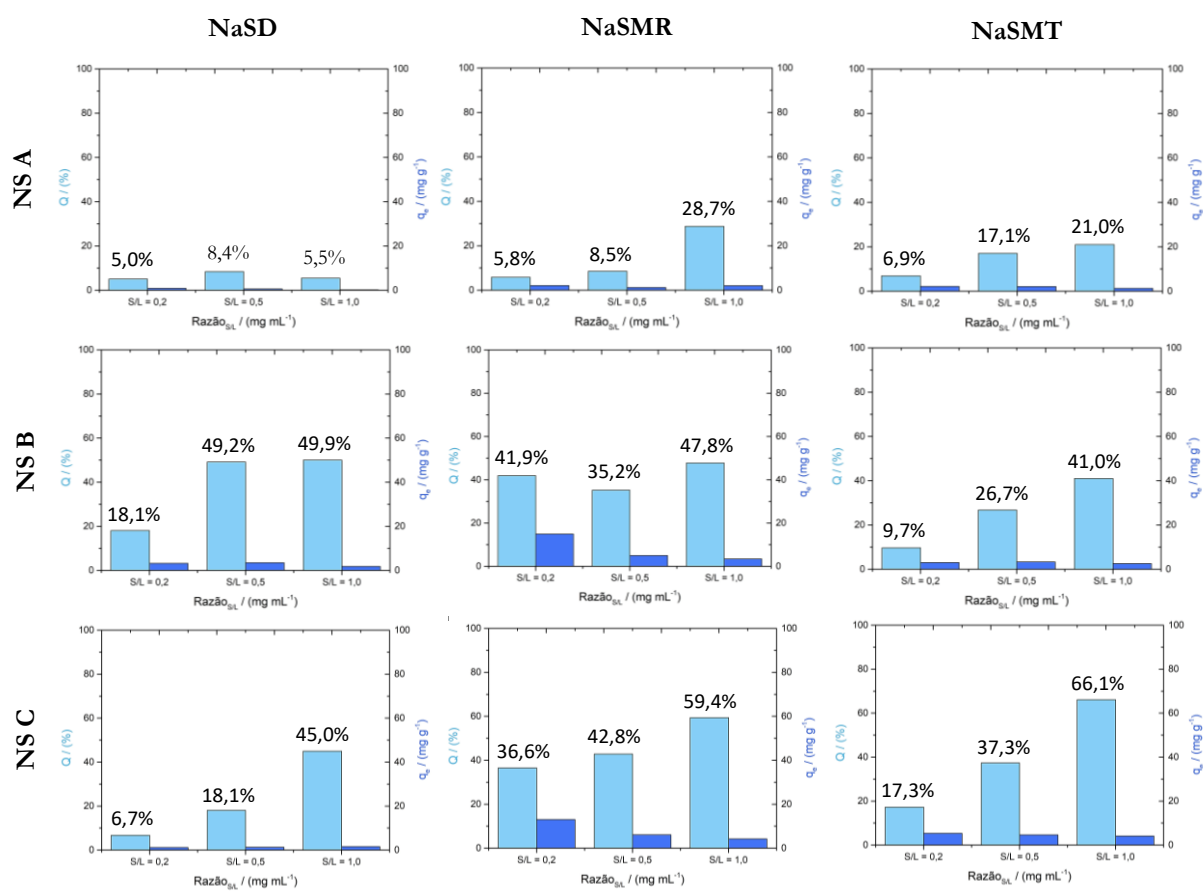


Figura 36 Efeito da razão sólido/líquido na capacidade e eficiência de adsorção das NaSAs (NaSD, NaSMR e NaSMT) a 25 °C, por parte das NS A (CD-am₆-CD), NS B (CD-am₆=GLT=am₆-CD) e NS C (CD-am₆-GLT-am₆-CD).

Todas as NSs apresentam grupos amina na sua estrutura. No entanto, a NS CD-am₆-CD tem um reticulante menor e apresenta menos grupos amina, enquanto a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD e NS CD-am₆-GLT-am₆-CD têm um reticulante maior, mas a primeira tem menos grupos amina e apresenta alguns grupos imina e a segunda tem apenas grupos amina em maiores proporções. A NS CD-am₆-GLT-am₆-CD mostrou um maior desempenho global nos ensaios de adsorção preliminares, seguida da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD e, em último, da NS CD-am₆-GLT-am₆-CD. Esta ordem de eficiência é proporcional à quantidade de grupos disponíveis na estrutura das NSs para formar ligações de hidrogénio, sendo que também é importante considerar o tamanho dos poros do material reticulante.

Tendo-se determinado a razão S/L de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ como a mais eficiente, fixou-se esta razão para os estudos de adsorção posteriores que consistiram na avaliação das eficiências de adsorção em função da concentração inicial de NaSMR. Utilizaram-se amostras com $1,0 \text{ mg}$ de NS CD- α_6 -CD e NS CD- α_6 =GLT= α_6 -CD dispersas em $1,0 \text{ mL}$ de diferentes soluções de NaSMR, com concentrações entre $9,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $200,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Verificou-se que a quantidade de NaSMR adsorvida por unidade NS aumenta com o aumento da concentração da solução de NaSMR, indicando um processo governado por um gradiente de concentração. As eficiências de adsorção e as isotérmicas ajustadas pela equação de Freundlich, (6.4), estão representadas na figura 37 para ambos os NSs e os parâmetros associados são relatados na tabela 16.

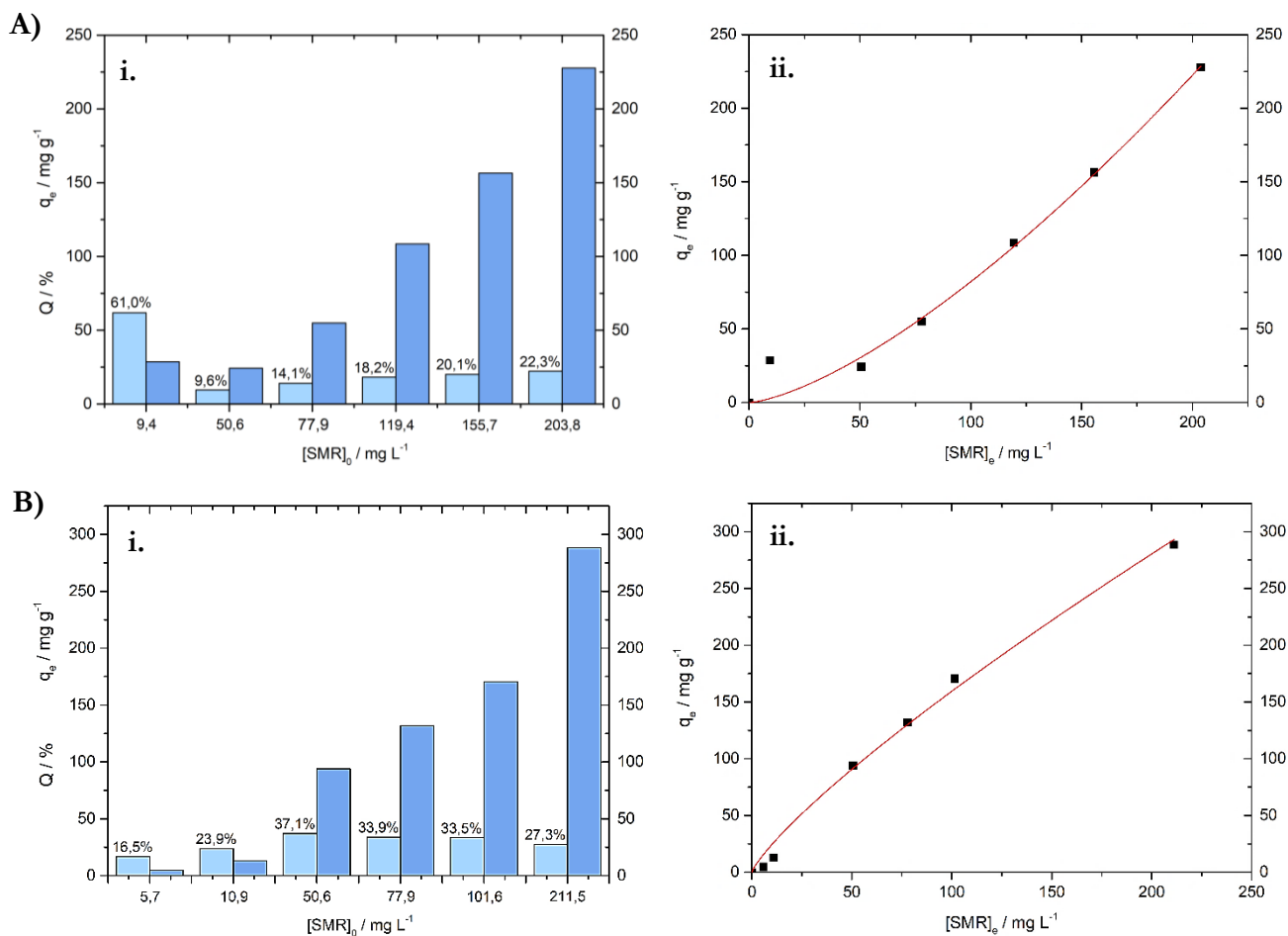


Figura 37 Eficiências de adsorção (i.) e isotérmicas ajustadas pela equação de Freundlich ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) (ii.) para a **A)** NS CD- α_6 -CD e **B)** NS CD- α_6 =GLT= α_6 -CD.

Tabela 16 Parâmetros obtidos no ajuste com a equação de Freundlich (25 °C) para a adsorção de NaSMR em água com NS CD-am₆-CD e CD-am₆=GLT=am₆-CD; otimiza relação S/L de 1,0 mg mL⁻¹.

CD-am ₆ -CD			CD-am ₆ =GLT=am ₆ -CD		
n_F	$K_F /$ $\text{mg}^{1-1/n_F} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n_F}$	R^2	n_F	$K_F /$ $\text{mg}^{1-1/n_F} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n_F}$	R^2
0,70 ± 0,07	0,11 ± 0,08	0,9786	1,23 ± 0,07	3,74 ± 0,86	0,9928

Com o aumento da concentração de NaSMT verifica-se que ocorre uma variação pouco significativa para as eficiências de remoção, o que se pode dever à saturação dos polímeros e à maior competição entre as interações NaSMT'-NaSMT' e NS-NS, sendo que para a NS CD-am₆-CD as percentagens aumentam e para a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD diminuem.

A aplicabilidade da equação isotérmica para descrever o processo de adsorção é determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) e, em ambas as NSs, há um ajuste mais preciso com a isoterma de Freundlich em comparação com a isoterma de Langmuir, onde o ajuste não foi verificado. Portanto, o modelo de Freundlich é capaz de explicar a variação dos dados obtidos e é aplicado a sistemas de sorção heterogêneos e multicamadas, permitindo a descrição de mecanismos de sorção não ideais e reversíveis. Os termos heterogêneo e multicamadas indicam que os sítios de interação possuem diferentes energias de adsorção, com formação de camadas sucessivas com força de ligação decrescente, de forma que a distribuição do tamanho dos poros na superfície pode influenciar na intensidade da interação. Sendo $n_F = 0,70$ para a NS CD-am₆-CD e $n_F = 1,23$ para a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD, verifica-se que o processo é favorável apenas para a NS CD-am₆=GLT=am₆-CD, o que é corroborado pela forma das isotérmicas – no caso da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD tem um formato côncavo, sugerindo um processo mais favorável, enquanto no caso da NS CD-am₆-CD a forma é ligeiramente convexa. O valor de K_F representa a capacidade de adsorção e é maior para o NS CD-am₆=GLT=am₆-CD, indicando novamente um processo mais favorável para esta NS. As diferenças nos valores dos parâmetros obtidos no ajuste da equação de Freundlich revelam diferenças entre as superfícies envolvidas na adsorção. Os resultados obtidos sugerem que com a NS CD-am₆-CD ocorre um processo de fisissorção cooperativa em multicamadas NaSMR, através de interações eletrostáticas (desfavoráveis), o que se verifica na diminuição dos valores de Q para baixas concentrações de NaSMR e numa variação para valores maiores.

Capítulo 6. Nanoesponjas de Ciclodextrinas

Por outro lado, o mecanismo de adsorção de NS CD- α -GLT- α -CD parece consistir em um processo essencialmente controlado por quimissorção em multicamadas de NaSMR, justificado por pontes de hidrogénio (favorável), o que se verifica na pequena variação dos valores de Q , aumentando ligeiramente para concentrações mais baixas de NaSMR e diminuindo ligeiramente para concentrações mais altas. Estes resultados comprovam a maior afinidade das NSs com reticulantes de maiores dimensões possivelmente devido à possibilidade de maior capacidade de formação de ligações de hidrogénio

Capítulo 7

7. Conclusões e Perspetivas Futuras

O uso generalizado de antibióticos faz com que estes sejam considerados um novo grupo de poluentes ambientais, com potencial para a propagação de resistência antimicrobiana. A sua presença nos diferentes corpos de água reflete a dificuldade das atuais tecnologias usadas nas ETARs para a sua remoção.

Neste projeto científico foi estudada a interação entre vários macrociclos (α -CD, β -CD e γ -CD) e antibióticos (NaSD, NaSMR e NaSMT) de forma a compreender as interações preponderantes na formação de compostos supramoleculares, através de técnicas como difusão isotérmica, espectroscopia de UV-vis, espectroscopia de RMN e ITC. Estes estudos permitem otimizar a projeção de materiais capazes de remover esta classe de antibióticos da água, nomeadamente as NSs de β -CD (NS CD-am₆-CD, NS CD-am₆=GLT-am₆-CD e NS CD-am₆-GLT-am₆-CD). A complementação destes dois estudos é essencial devido à possibilidade da complexação dos antibióticos nas cavidades das CDs e/ou na rede polimérica das NSs.

O estudo de difusão isotérmica, utilizando o método de dispersão de Taylor, permitiu obter uma primeira confirmação sobre a interação entre as NaSAs e as CDs. Os valores de D são maiores para as análogas mais pequenas (NaSD > NaSMR > NaSMT e α -CD > β -CD > γ -CD). Relativamente aos sistemas ternários de NaSAs (componente 1) + CDs (componente 2) + água obtiveram-se valores negativos para D_{12} , indicando a ocorrência de fluxos acoplados contra-corrente que sugerem a formação de complexos entre CDs e NaSAs, sendo este efeito muito baixo para o caso da α -CD, aumentando para a β -CD e ainda mais para a γ -CD. A NaSMR é o antibiótico que parece ter uma maior interação com as CDs, chegando a atingir o valor mais negativo de D_{12} com a γ -CD ($D_{12} \approx -1,45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para $X_1 = 1$). Os valores de D_{21} são bastante baixos e positivos, ocorrendo apenas o co-transporte das CDs por parte das NaSAs. Uma mole de γ -CD consegue contra-transportar 0,255 mol de NaSD e 0,301 mol de NaSMR e uma mole de β -CD consegue contra-transportar 0,331 mol de NaSMT, sendo estes os maiores valores registados. Recorreu-se a um modelo matemático para sistemas que envolvem a formação de complexos de inclusão com estequiometria 1 : 1, o qual aproximou os valores experimentais de D_{12} da NaSMR para valores de K até $10 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ no caso da α -CD, até

Capítulo 7. Conclusões e Perspetivas Futuras

20 dm³ mol⁻¹ para a β -CD e até 30 dm³ mol⁻¹ com a γ -CD, aproximadamente. Ainda foi possível estimar os R_{hi} para os iões SA⁻: R_{hi} (SD⁻) = 3,10 Å, R_{hi} (SMR⁻) = 3,34 Å e R_{hi} (SMT⁻) = 3,19 Å. Estes resultados, juntamente com a tendência observada nos valores de D^0 das NaSAs (NaSD > NaSMT⁻ > NaSD), sugerem uma maior estruturação da água em torno do ião SMT⁻ atribuída à substituição dos dois grupos metilo no anel pirimidínico que lhe conferem uma maior mobilidade em solução aquosa, livre de outras entidades de soluto, do que o ião SMR⁻, apesar da maior hidrofobicidade do ião SMT⁻. Verifica-se que a cavidade da α -CD tem dimensões relativamente pequenas para acomodar os iões SA⁻, enquanto a β -CD e γ -CD apresentam dimensões que capacitam a acomodação de uma maior parte da estrutura dos iões SA⁻ em água. Os estudos de difusão intermolecular sugerem que a γ -CD parece ser a CD que forma complexos mais estáveis com as NaSAs em solução aquosa.

Nos estudos de espectroscopia de UV-vis foram registadas alterações nos espectros UV-vis da NaSMR, em concentração constante, com o aumento da concentração de β -CD, ocorrendo uma diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocrómico), enquanto o aumento da concentração de γ -CD mostrou um aumento da intensidade de absorção (efeito hiperocrómico). As variações registadas são indicativas de uma mudança do microambiente da NaSMR como consequência da sua complexação na cavidade das CDs. As tendências relatadas demonstram que a β -CD e a γ -CD interagem com a NaSMR por processos diferentes. As entidades de NaSMR podem adotar uma conformação que na cavidade da γ -CD permita uma maior sobreposição das orbitais eletrónicas relevantes para a absorção de luz (efeito hiperocrómico) e que na cavidade da β -CD adote uma conformação diferente que não permita essa mesma sobreposição (efeito hipocrómico). Através do método de Benesi-Hildebrand foi possível calcular as constantes de associação com a técnica UV-vis, tendo-se obtido um valor de 26 dm³ mol⁻¹ para o sistema β -CD + NaSMR e 93 dm³ mol⁻¹ para o sistema γ -CD + NaSMR, sugerindo, novamente, que a γ -CD forma complexos mais estáveis com as NaSAs em solução aquosa.

Através de ¹H-RMN verificou-se que a adição de NaSMR provoca uma alteração no ambiente químico dos prótons internos da β -CD (H₃ e H₅) para valores de campo mais alto, assim como um desdobramento dos sinais. Também foram observadas alterações nos desvios químicos dos sinais referentes aos prótons da NaSMR, especialmente para o sinal do próton H_A (anel A da NaSMR), para o qual também se observa uma variação da constante de acoplamento, o que sugere que a interação entre as duas espécies provoca uma alteração conformacional na estrutura da NaSMR, tal como foi mencionado nos estudos de UV-vis.

Capítulo 7. Conclusões e Perspetivas Futuras

Utilizando várias soluções com diferentes razões molares $[\beta\text{-CD}]/[\text{NaSMR}]$ e mantendo $[\beta\text{-CD}]$ constante, foi possível convergir os dados obtidos para os desvios químicos do próton H_3 a um ajuste não linear e estimar uma constante de associação para o complexo supramolecular $\beta\text{-CD} : \text{NaSMR}$ (1 : 1) de $99 \pm 60 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. É importante ter em consideração que os valores da constante de associação obtidos em solventes deuterados são um pouco diferentes dos valores obtidos na água. Estas alterações nos espectros de ^1H -RMN corroboram a formação de um complexo de inclusão e apontam para a incorporação de uma parte do anel A da NaSMR na cavidade hidrofóbica da $\beta\text{-CD}$, podendo esta preferência dever-se à maior estruturação da água relatada em torno do anel B das NaSAs.

A ITC mostrou que não foi possível detetar interação entre as NaSAs e CDs, uma vez que esta técnica se torna complexa para detetar a interação, através do calor libertado, de complexos supramoleculares de baixa estabilidade, isto é, com baixos valores do parâmetro c de Wiseman e com constantes de associação inferiores a 10^2 mol dm^{-3} , como se verificou nos estudos anteriores.

Verificou-se que as interações mais efetivas ocorreram entre a NaSMR e a $\beta\text{-CD}$ e $\gamma\text{-CD}$, sugerindo que o aumento do tamanho da cavidade das CDs favorece a interação com as NaSAs devido a uma geometria de inclusão mais favorável. Contudo, comparando os valores de K obtidos neste estudo com os de outros sistemas semelhantes [135–137], verifica-se que as NaSAs e CDs formam complexos supramoleculares pouco estáveis.

Os valores de K determinados para as NaSAs e CDs estudadas variam consideravelmente, evidenciando a dificuldade de investigar correlações entre diferentes sistemas dependendo do método experimental e/ou modelo utilizado para interpretar os dados. É notável que as diferentes técnicas experimentais possuem sensibilidades distintas para detetar essas interações. Algumas técnicas são mais aptas a identificar interações fracas, enquanto outras podem não ser capazes de discernir associações de baixa estabilidade. Isso, por sua vez, pode gerar discrepâncias nas K obtidas através de diferentes métodos. Para ser possível determinar as K de forma precisa é importante realizar uma determinação estequiométrica prévia e obter um número adequado de pontos de dados, em particular na faixa de razão molar abaixo da razão estequiométrica.

As condições experimentais das diferentes técnicas podem influenciar a capacidade de interação entre as NaSAs e as CDs e levar a diferentes valores de K , sendo importante considerar alguns fatores no estudo de complexos de inclusão, como: a concentração, pois as interações podem ser mais pronunciadas em faixas específicas de concentração; o tempo

Capítulo 7. Conclusões e Perspetivas Futuras

de incubação, uma vez que algumas interações podem levar algum tempo até atingir o equilíbrio; a temperatura, que pode influenciar a velocidade e estabilização das interações; o valor de pH, que pode influenciar a carga e a conformação das espécies, afetando a interação entre ambas; os solventes, os quais podem facilitar interações e/ou melhorar a solubilidade das substâncias, o que permite efetuar estudos com concentrações maiores; o meio, visto que a presença de outras substâncias pode influenciar as associações supramoleculares, como a existência de moléculas ou iões em solução, como o Na^+ , que podem competir com as NaSAs no processo de inclusão na cavidade das CDs, o que já foi relatado noutros estudos [138].

Procedeu-se à síntese de três NSs: NS CD- α -CD, resultante da reticulação da β -CD com α -CD; NS CD- α -CD=GLT= α -CD, resultante da reticulação da β -CD com α -CD e GLT; NS CD- α -CD-GLT- α -CD, resultante da redução da NS CD- α -CD=GLT= α -CD com NaBH_4 . Foram detetadas algumas dificuldades na síntese das NSs, especificamente na etapa da aminação, relativamente à fonte de energia utilizada para promover a reticulação de I-CD com α -CD e às lavagens efetuadas para limpar o excesso de α -CD que não reagiu com I-CD para formar o precursor α -CD. O método de aquecimento adotado influenciou algumas características da NS α -CD- α -CD, sendo que o aquecimento convencional provocou uma maior degradação do material, como confirmado por TGA e também visível na cor mais escura do produto final. A escolha do micro-ondas como método de aquecimento mostra ser mais benéfica na preservação das características do material reticulado, para além de consistir num método alternativo mais sustentável, rápido, eficiente e económico. Adicionalmente, na etapa das lavagens com dietiléter foram necessárias menos lavagens quando o método de aquecimento selecionado era o micro-ondas. No entanto, foram obtidas quantidades muito pequenas de precursor, o que limitou a utilização das NSs em estudos posteriores. A possibilidade de usar um solvente diferente que seja mais seletivo na remoção da diamina não reagida e menos propenso a solubilizar o precursor seria útil para otimizar a síntese destes materiais.

A eficiência de substituição dos precursores e o excesso de diamina após as lavagens mencionadas anteriormente foram determinados por ^1H -RMN. Algumas estruturas químicas foram caracterizadas por FTIR-ATR, revelando que nem toda a I-CD foi efetivamente reticulada. A estabilidade térmica das NSs foi avaliada por TGA e observou-se uma diminuição da estabilidade térmica, relativamente à β -CD, para a NS CD- α -CD, ao contrário das NSs CD- α -CD=GLT= α -CD e CD- α -CD-GLT- α -CD, para as quais se observou uma estabilidade térmica semelhante ou aprimorada, respetivamente, que pode

Capítulo 7. Conclusões e Perspetivas Futuras

estar associada à formação de uma estrutura altamente reticulada. Torna-se relevante efetuar uma caracterização mais detalhada da morfologia, tamanho e distribuição dos poros das NSs, através de SEM, assim como a determinação da área superficial específica e distribuição do tamanho dos poros, através da análise de adsorção–dessorção de N₂ (BET), de forma a obter uma caracterização mais detalhada do polímero e compreender como é que as entidades de antibiótico interagem na superfície do material.

Nos ensaios de adsorção preliminares verificou-se que o aumento da razão S/L, de 0,2 mg mL⁻¹ a 1,0 mg mL⁻¹, levou a um aumento das eficiências de remoção e a uma diminuição das capacidades de adsorção, respetivamente: 5,0% a 28,7% e 2,1 mg mL⁻¹ a 0,2 mg mL⁻¹ para a NS CD–am₆–CD; 9,7% a 49,9% e 14,9 mg mL⁻¹ a 1,8 mg mL⁻¹ para a NS CD–am₆=GLT=am₆–CD; 6,7% a 66,1% e 13,0 mg mL⁻¹ a 1,2 mg mL⁻¹ para a NS CD–am₆–GLT–am₆–CD. Esta ordem de eficiência é proporcional à quantidade de grupos disponíveis na estrutura das NSs para formar ligações de hidrogénio. Os resultados confirmam que a introdução de grupos funcionais adequados na estrutura das NSs permite uma remoção eficiente de poluentes, demonstrando assim o potencial que esta classe de materiais apresenta neste tipo de aplicações.

Fixando a razão S/L de 1,0 mg mL⁻¹, e utilizando soluções de NaSMR com concentrações entre 9,4 mg L⁻¹ e 200,3 mg mL⁻¹, verifica-se que ocorre uma variação pouco significativa para as eficiências de remoção, o que se pode dever à saturação dos polímeros. O modelo de Freundlich explica a variação dos dados obtidos, tendo-se obtido os parâmetros $n_F = 0,70$ e $K_F = 0,11 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ para a NS CD–am₆–CD e $n_F = 1,23$ e $K_F = 3,74 \text{ mg}^{1-1/n_F} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{1/n_F}$ para a NS CD–am₆=GLT=am₆–CD. As diferenças nos valores dos parâmetros obtidos no ajuste da equação de Freundlich revelam diferenças entre as superfícies envolvidas na adsorção, sugerindo que com a NS CD–am₆–CD ocorre um processo de fisissorção cooperativa em multicamadas NaSMR, através de interações eletrostáticas (desfavoráveis), enquanto o mecanismo de adsorção da NS CD–am₆=GLT=am₆–CD parece ser essencialmente controlado por quimissorção em multicamadas de NaSMR, justificado por pontes de hidrogénio (favoráveis).

É importante apontar algumas perspetivas futuras a considerar neste projeto científico. Numa primeira instância, a exploração de outras técnicas analíticas e simulações computacionais permite adquirir uma visão mais abrangente sobre as interações entre as NaSAs e as CDs. A investigação aprofundada da relação entre a estrutura molecular de ambas as espécies através de técnicas computacionais também se torna útil para a seleção e

Capítulo 7. Conclusões e Perspetivas Futuras

modificação de CDs que maximizem a formação de complexos mais estáveis. Relativamente à aplicação das NSs, seria importante considerar sistemas mais complexos, como sistemas aquáticos naturais ou sistemas de tratamento de água, devido à necessidade de avaliar a eficácia e o impacto destes materiais em cenários reais. É também importante considerar a viabilidade técnica e económica da sua aplicação em grande escala. A fabricação e implantação desses materiais devem ser acessíveis e sustentáveis. Existem alguns desafios que devem ser considerados em estudos posteriores, como a seletividade destes materiais para os antibióticos alvo, de forma a garantir que não afetam outros componentes essenciais da água. Surge assim o interesse de explorar áreas complementares, como engenharia de materiais, que possam melhorar a adsorção, seletividade, regeneração e reutilização das NSs.

Capítulo 8

8. Secção Experimental

Neste capítulo é fornecida informação acerca dos reagentes, solventes, técnicas e instrumentação utilizados no trabalho laboratorial deste projeto científico.

8.1. Materiais

A NaSD (pureza $\geq 98\%$, CAS 68-35-9), NaSMR (pureza $\geq 98\%$, CAS 127-79-7) e NaSMT (pureza $\geq 98\%$, CAS 57-68-1) foram obtidas na Sigma-Aldrich e a α -CD (pureza 98%, CAS 10016-20-3), β -CD (pureza 98%, CAS 7585-39-9) e γ -CD (pureza 98%, CAS 17465-86-0) foram fornecidas pela Sigma-Aldrich. Utilizou-se água ultrapura milli-Q produzida localmente (*Millipore* mod. Direct Q® 3UV-R, 18,2 Ω m a 298,15 K) e água deuterada (D₂O) (pureza 99,9%, CAS 7789-20-0) fornecida pela Sigma-Aldrich. O ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-d₄ sal de sódio (TMSP) (pureza 98%, CAS 24493-21-8) foi obtido na Eurisotop. A trifenilfosfina (Ph₃P) foi adquirida da Alpha Aesar (CAS 603-35-0) e o iodo (I₂) foi fornecido como pérolas resublimadas pela PanReac (CAS 7553-56-2). Os reticulantes, hexano-1,6-diamina (am₆) (CAS 124-09-4) e glutaraldeído (GLT) (CAS 111-30-8), foram ambos adquiridos da Sigma-Aldrich. A N,N-dimetilformamida (DMF) foi obtida da Honeywell (pureza $\geq 99,8\%$, CAS 68-12-2) e seca usando peneiras moleculares. O metanol (MeOH) foi obtido da Chem-Lab (pureza 99,8% grau HPLC, CAS 67-56-1), o etanol (EtOH) da PanReac (pureza $\geq 99,8\%$, CAS 64-17-5), o éter dietílico ((C₂H₅)₂O) da Honeywell (CAS 60-29-7) e o NaBH₄ da Sigma-Aldrich (CAS 16940-66-2). O dimetilsufóxido (DMSO) foi fornecido pela Eurisotop (pureza 99,9%, CAS 67-68-5). Devido ao elevado grau de pureza, os reagentes e solventes não sofreram qualquer processo de purificação adicional.

8.2. Instrumentação

- **Difusão intermolecular em líquidos.** Os coeficientes de difusão foram obtidos à temperatura de 25 °C num equipamento construído segundo o sistema de dispersão de Taylor.
- **Espetroscopia de Ultravioleta–visível (UV–vis).** Os espectros de UV–vis foram obtidos através de um espectrofotómetro *Shimadzu UV–2600i* na faixa de comprimentos de onda entre os 200 e 800 nm, utilizando uma *cuvette* de quartzo com percurso ótico de 1 cm.
- **Espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).** Os espectros de ¹H–RMN foram realizados à temperatura ambiente num espectrómetro *Bruker Avance III*, 400 MHz. Os compostos foram dissolvidos em D₂O e utilizou–se TMS⁺ como referência interna.
- **Calorimetria de titulação isotérmica.** As titulações foram realizadas utilizando o equipamento *MicroCal™ VP–ITC*, com um volume de 1436 µL, a 25 °C. A velocidade de rotação foi 307 rpm e a potência de referência foi 5 µcal s⁻¹. A titulação procedeu–se com adições de 10 µL, perfazendo um total de 29 injeções.
- **Espetroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* – refletância total atenuada (FTIR–ATR).** Os espectros de FTIR–ATR foram realizados à temperatura ambiente num espectrómetro *Agilent Technologies Cary 360* na gama de números de onda entre 4000 – 650 cm⁻¹.
- **Análise Termogravimétrica (TGA).** Os termogramas foram obtidos em um dispositivo *Nietzsch Tarsus TG 209 F3*, utilizando ~ 3,0 mg de amostra em cadinho de alumina (Al₂O₃), com uma purga de azoto de fluxo igual a 50 mL min⁻¹, uma gama de temperatura entre 25 – 800 °C e uma velocidade de varrimento de 10 °C min⁻¹.
- **Ultrassons.** As soluções foram sonificadas num equipamento de sonoquímica *Bandelin Sonorex RK100H*, com frequência de 35 kHz e potência de 80/160 W.
- **Micro–ondas.** As reações assistidas por micro–ondas foram realizadas num micro–ondas *CEM Discover S–Class* com um tubo de vidro de 10 mL e monitorização constante de temperatura, pressão e potência, cujo valor máximo estabelecido foi de 250 W.
- **Instrumentação auxiliar.** As amostras foram desidratadas num liofilizador *Labconco Freezone 4.5*, centrifugadas num centrifugador *Paralab ZWY–103B* e secadas numa estufa *Heraeus*.

8.3. Métodos

8.3.1. Difusão Intermolecular em líquidos

Nos estudos de difusão de sistemas binários foram preparadas apenas duas soluções, a solução de fluxo e a solução de injeção, enquanto nos estudos de difusão de sistemas ternários tiveram de ser preparadas três soluções diferentes, a solução de fluxo e duas soluções de injeção. Todo o material de vidro (classe A) utilizado na preparação das soluções foi cuidadosamente lavado com uma passagem de água destilada e outra com água ultra-pura milli-Q, sendo posteriormente colocado na estufa a 50 °C para secar e arrefecido em local protegido.

Antes de cada experiência foi realizada uma limpeza do sistema fazendo passar um fluxo de água ultra-pura milli-Q até estabilizar a linha de base, fazendo passar de seguida a solução de fluxo até estabilizar novamente a linha de base. A solução de fluxo foi colocada no sistema através da extremidade do tubo de dispersão (VFW, teflon, comprimento $(3279,9 \pm 0,1)$ cm e raio interno $(0,0322 \pm 0,0003)$ cm), que atravessa o sistema completo e está mantido à temperatura de 25 °C num termostato de ar. O fluxo de $0,23 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ é gerado por uma bomba peristáltica de precisão (*Gilson model Minipuls 3*). Foi utilizada uma válvula de injeção de seis entradas (*Rheodyne model 5020*) para introduzir amostras de $0,063 \text{ cm}^3$ de solução no fluxo laminar com uma seringa de 3 mL para encher o loop da amostra com a solução que será dispersa (é de extrema importância certificar que não existem bolhas de ar). Ao acionar a válvula, o fluxo passa a interagir com a amostra, iniciando a difusão. No extremo distal do tubo está instalado um refratómetro diferencial (*Waters mod. 2410*) para monitorizar o fenómeno de dispersão. O detetor gera tensões, $V(t)$, que são medidas em intervalos de 15 segundos com um voltímetro digital (*Agilent mod. 34401A*), e apresenta duas células, uma célula de referência dinâmica no extremo proximal do tubo onde o fluxo passa continuamente; e uma célula de amostra no extremo distal do tubo. Esta instalação permite minimizar os efeitos de velocidade na refração medida pelo detetor. Para cada medida são realizadas cinco leituras de $V(t)$, onde os valores extremos, maior e menor, são desprezados, sendo feita a média dos três valores intermédios que é guardada no sistema informático. São efetuadas, no mínimo, duas injeções para cada sistema.

8.3.2. Espectroscopia Ultravioleta-visível

As soluções descritas nos estudos de UV-vis foram preparadas com água ultra-pura milli-Q e agitadas por 30 min para induzir a formação de complexos de inclusão.

Em 5 frascos foram adicionados 1 mL de uma solução de $0,0050 \text{ mmol dm}^{-3}$ NaSA e 1 mL de soluções de 0, 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 mmol dm^{-3} CD. Obtiveram-se os espectros UV-vis de cada solução e as constantes de associação dos complexos de inclusão foram determinadas pelo método de Benesi-Hildebrand, através do ajuste dos dados obtidos à regressão linear descrita na equação (3.5).

8.3.3. Ressonância Magnética Nuclear

As soluções descritas nos estudos de ^1H -RMN foram preparadas com D_2O como solvente, TMS P como referência interna e agitadas por 30 min para induzir a formação de complexos de inclusão.

Numa primeira fase foram obtidos espectros ^1H -RMN de soluções de $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ NaSA, $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ CD e $(5,0 : 5,0) \text{ mmol dm}^{-3}$ NaSA : CD, de forma a avaliar se os sinais dos protões de ambas as espécies se sobrepunham e se era detetada alguma interação entre ambas.

A determinação da estequiometria dos complexos NaSA : CD foi estudada pelo método de variação contínua (gráfico de Job) e envolveu a preparação de soluções com NaSA e CD em diferentes proporções, mantendo constante a concentração total $[\text{NaSA}] + [\text{CD}]$ igual a $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ para cada solução. Foram preparadas soluções-mãe de NaSA e CD, ambas com concentrações de $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ e, a partir destas, prepararam-se soluções de NaSA : CD com concentrações $(0,5 : 4,5) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(1,0 : 5,0) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(1,5 : 3,5) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(2,0 : 3,0) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(2,5 : 2,5) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(3,0 : 2,0) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(3,5 : 1,5) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(4,0 : 1,0) \text{ mmol dm}^{-3}$, $(4,5 : 0,5) \text{ mmol dm}^{-3}$. Não foi possível construir o gráfico de Job com os resultados obtidos.

Para a determinação da constante de associação foram preparadas soluções com NaSA e CD, mantendo constante a $[\text{CD}]$ ($5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) e variando a $[\text{NaSA}]$ (3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0), obtendo-se soluções com razão $[\text{NaSA}]/[\text{CD}]$ de 0,6; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0; respetivamente. As constantes de associação dos complexos de inclusão foram determinadas através do ajuste dos dados obtidos à regressão não linear descrita na equação (4.4).

8.3.4. Calorimetria de Titulação Isotérmica

As soluções descritas nos estudos de ITC foram preparadas com água ultra-pura milli-Q e desgaseificadas durante 10 min de forma a eliminar possíveis bolhas de ar na amostra.

O aparelho possui duas células idênticas, uma célula para a amostra e outra para a referência, ambas revestidas por uma câmara adiabática e monitorizadas de forma a manter o equilíbrio térmico ao longo da titulação, e uma seringa de alta precisão incorporada no aparelho para injetar as soluções na célula da amostra. A injeção das soluções na célula e consequente interação entre as soluções provoca uma diferença de temperatura entre a célula que contém a amostra e a de referência. O calor trocado durante a interação corresponde à energia que é necessária para o equipamento repor o equilíbrio térmico após a injeção.

Inicialmente realizaram-se titulações de cada componente com água, com água na seringa de alta precisão e 1 mmol dm^{-3} NaSA na célula da amostra e 1 mmol dm^{-3} CD na seringa de alta precisão e água na célula da amostra, de forma a calcular os calores de diluição que serão descontados nos calores associados à interação entre espécies. Em cada experiência foram colocadas soluções de 5 mmol dm^{-3} CD na seringa de alta precisão e tituladas para as soluções de 1 mmol dm^{-3} NaSA na célula da amostra. Realizaram-se experiências com outras condições experimentais, onde se alterou a gama de concentrações (1 mmol dm^{-3} NaSA e 10 mmol dm^{-3} CD) e os valores de temperatura (10 e 40 °C) durante a titulação.

Os termogramas obtidos foram integrados com o *software* de análise de dados *Origin 7.0* modificado pela *Microcal* para analisar experiências de ITC. O calor previsto no processo de titulação é calculado através da equação (5.3).

8.3.5. Síntese e Caracterização das Nanoespojas de Ciclodextrinas

Para a síntese de I-CD foi utilizada a Ph_3P ($3,00 \times 10^{-2}$ mol; 7,87 g) como catalisador, tendo sido dissolvida em 30 mL de DMF anidro. A esta mistura adicionou-se cuidadosamente I_2 em excesso ($3,22 \times 10^{-2}$ mol; 8,17 g) e, após dissolução completa, foi adicionada β -CD seca ($2,01 \times 10^{-3}$ mol, 2,97 g). A solução foi agitada com aquecimento a 60 °C durante 18 h sob atmosfera de N_2 . De seguida, arrefeceu-se a solução à temperatura ambiente e foi concentrada por remoção de solvente (ca. 60 %). Preparou-se uma solução de NaOMe para a qual se pesaram cuidadosamente 0,79 g de Na metálico e se adicionaram a 12 mL de MeOH em um banho de gelo com agitação. Esta solução foi adicionada à

preparada anteriormente, durante 30 min, com o objetivo de precipitar o produto desejado, I-CD. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com excesso de MeOH e extraído com Soxhlet utilizando MeOH até que não seja detetada mais descoloração pelo solvente. O produto purificado obtido consiste em um pó branco que foi liofilizado e armazenado no exsiccador até posterior uso.

A síntese de am₆-CD foi realizada utilizando am₆, a qual reage facilmente com I-CD através de uma reação de substituição nucleofílica do iodo na posição C₆ com um dos grupos amina da diamina, ficando o outro grupo amina livre para a posterior reticulação no passo final das nanoesponjas. Para tal, existem duas formas de iniciar esta etapa da síntese e em ambas mistura-se I-CD ($2,64 \times 10^{-4}$ mol; 0,50 g) com um excesso de 20× de am₆ ($3,70 \times 10^{-2}$ mol; 4,35 g). Através da forma convencional, os reagentes são misturados com 5 mL de DMF anidro e aquecidos a 70 °C com agitação durante 48 h sob atmosfera de N₂, mas a mesma etapa é conseguida através de micro-ondas, num tubo de micro-ondas de 10 mL com 4 mL de DMF anidro para assegurar a dissolução completa, com controlo de temperatura a 85 °C durante apenas 30 min. A solução obtida foi adicionada, gota a gota, a 200 mL de (C₂H₅)₂O com agitação e, após 1 h, o precipitado foi solubilizado com MeOH para se repetir o processo. Efetuaram-se vários ciclos de lavagem. Posteriormente, filtrou-se o precipitado a vácuo e lavou-se com (C₂H₅)₂O. O produto consiste em um pó branco amarelado que foi liofilizado e armazenado no exsiccador para uso posterior.

A última etapa na síntese da NS CD-am₆-CD consiste na reação equimolar 1 : 1 de am₆-CD ($1,31 \times 10^{-4}$ mol; 0,25 g) com I-CD ($1,31 \times 10^{-4}$ mol; 0,24 g) através de ação mecânica por moagem, tendo sido adicionado DMSO anidro de forma a homogeneizar a mistura dos dois reagentes. A pasta obtida foi aquecida a 70 °C durante 48 h e o produto resultante, com o aspeto de uma goma castanha, foi rapidamente esmagado mecanicamente com a adição faseada de água até completar 10 mL. O sólido foi submetido a centrifugação, seguido de sonicação em ultrassons com frequência de 35 kHz e potência de 80/160 W, durante 10 min em 10 mL de MeOH. Efetuaram-se três ciclos de lavagem com MeOH e uma lavagem final com (C₂H₅)₂O. Já a última etapa na síntese da NS CD-am₆=GLT-am₆-CD consiste na reação na proporção 1 : 7 de am₆-CD ($3,84 \times 10^{-4}$ mol; 0,10 g) com GLT ($1,15 \times 10^{-3}$ mol; 0,12 g). Após a reação foram efetuados os mesmos ciclos de lavagem que os descritos para a NS anterior. Por fim, na última etapa na síntese da NS CD-am₆-GLT-am₆-CD promoveu-se a redução da NS CD-am₆=GLT-am₆-CD com a adição de um volume de NaBH₄ correspondente a

5× o número de moles de NS, pelo que foram utilizados 50 mL de NaBH₄ para 0,5 g da NS CD-am₆=GLT=am₆-CD. As NSs obtidas foram liofilizadas e armazenadas no exsiccador.

A eficiência de substituição de I-CD e am₆-CD foi determinada por ¹H-RMN, a estrutura química de am₆-CD e das NSs foi caracterizada por FTIR-ATR e a estabilidade térmica das NSs foi avaliada por TGA.

8.3.6. Ensaio de Adsorção

As soluções utilizadas nos ensaios de adsorção foram preparadas com água ultra-pura milli-Q.

Com o intuito de monitorizar a concentração das entidades de antibiótico nas soluções aquosas, recorreu-se à espectroscopia de absorção no UV-vis. Esta técnica permite a deteção quantitativa de uma espécie presente em solução através da absorção quantizada de luz, de acordo com a lei de Beer-Lambert descrita na equação (3.1).

Os antibiótico de NaSAs – NaSD, NaSMR e NaSMT – absorvem no UV-vis nos $\lambda_{\text{máx}}$ de 260, 258 e 261 nm, respetivamente. Foram construídas curvas de calibração das NaSAs, tendo em conta a faixa de concentrações adequada para medidas quantitativas, na qual a relação entre a absorvância e a concentração é linear ($A < 1$). Desta forma, é possível detetar a concentração de antibiótico em solução aquosa após os ensaios de adsorção com as NSs.

A compreensão do mecanismo de adsorção pode ser descrita através de isotérmicas de adsorção, para os quais foram determinadas as melhores condições experimentais. Determinou-se a razão sólido/líquido (S/L) mais eficiente, tendo sido utilizado 1 mg de NS em 5, 2 e 1 mL de solução (S/L = 0,2, 0,5 e 1 mg mL⁻¹, respetivamente), com C₀ de 10 mg L⁻¹. Fixando a razão S/L mais favorável para o processo de adsorção, variou-se a concentração de soluções de NaSMR de 0–200 ppm, aproximadamente, promovendo o contacto entre as NSs e as soluções de antibióticos, por incubação, durante 24 h, a 125 rpm e 25 °C. De seguida, todas as soluções foram filtradas para remover as NSs e, através da curva de calibração, foi determinada a quantidade de antibiótico presente em solução.

Os cálculos das capacidades e eficiências de adsorção foram efetuados através da aplicação das equações (6.1) e (6.2), respetivamente.

Bibliografia

- [1] Tarazona, N. A., Machatschek, R., Balcucho, J., Castro-Mayorga, J. L., Saldarriaga, J. F. & Lendlein, A. “Opportunities and challenges for integrating the development of sustainable polymer materials within an international circular (bio)economy concept”, *MRS Energy and Sustainability*, vol. 9, no. 1, pp. 19–25, (2022). doi: 10.1557/s43581-021-00015-7.
- [2] “Pacto Ecológico Europeu.”, https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_pt (accedido a 19 out. 2022).
- [3] “Plano de ação da UE: «Rumo à poluição zero no ar, na água e no solo»”, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52022IP0110&from=EN> (accedido a 19 out. 2022).
- [4] “COMUNICAÇÃO DA COMISSÃO AO PARLAMENTO EUROPEU, AO CONSELHO, AO COMITÉ ECONÓMICO E SOCIAL EUROPEU E AO COMITÉ DAS REGIÕES Caminho para um planeta saudável para todos Plano de ação da UE: «Rumo à poluição zero no ar, na água e no solo»”, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A52021DC0400&qid=1622736006203> (accedido a 19 out. 2022).
- [5] Rasheed, T., Bilal M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H. M. N. “Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment”, *Environ Int*, vol. 122, pp. 52–66, (2019). doi: 10.1016/j.envint.2018.11.038.
- [6] “Antibiotic resistance”, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (accedido a 19 out. 2022).
- [7] Tan, S. Y. & Tatsumura, Y. “Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin”, *Singapore Med J*, vol. 56, no. 7, pp. 366–367, (2015). doi: 10.11622/smedj.2015105.
- [8] Aminov, R. I. “A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future”, *Front Microbiol*, vol. 1, no. 134, (2010). doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- [9] Clift, C., Schulze, K. & Mossialos, E. “HEALTH SYSTEMS AND POLICY ANALYSIS Averting the AMR crisis What are the avenues for policy”.
- [10] Liu, Y., Cai, D., Wu, Q., Ding, P., Shen, L., Yang, J., Hu, G., Wu, J. & Zhang, L. “Occurrence, fate, and risk assessment of antibiotics in typical pharmaceutical manufactories and receiving water bodies from different regions”, *PLoS One*, vol. 18, no. 1, (2023). doi: 10.1371/journal.pone.0270945.

- [11] “Antibiotics: Are you misusing them?”, <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/consumer-health/in-depth/antibiotics/art-20045720> (accedido a 20 out. 2022).
- [12] Zubair, M., Li, Z., Zhu, R., Wang, J., Liu, X. & Liu, X. “The Antibiotics Degradation and Its Mechanisms during the Livestock Manure Anaerobic Digestion”, *Molecules*, vol. 28, no. 10, (2023). doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28104090>.
- [13] Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A. & Popowska, M. “Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture”, vol. 12, (2021). doi: [10.3389/fmicb.2021.610656](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656).
- [14] Pazda, M. Kumirska, J., Stepnowski, P. & Mulkiewicz, E. “Science of the Total Environment Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review”, *Science of the Total Environment*, vol. 697, p. 134023, (2019). doi: [10.1016/j.scitotenv.2019.134023](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023).
- [15] Al-Tawfiq, J. A., Momattin, H., Al-Ali, A. Y., Eljaaly, K., Tirupathi, R., Haradwala, M. B., Areti, S., Alhumaid, S., Rabaan, A. A., Mutair, A. A. & Schlagenhauf, P. “Antibiotics in the pipeline: a literature review (2017–2020)”, *Infection*, vol. 50, no. 3, pp. 553–564, (2022). doi: [10.1007/s15010-021-01709-3](https://doi.org/10.1007/s15010-021-01709-3).
- [16] Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H. M. N. “Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment”, vol. 122, pp. 52–66, (2019). doi: [10.1016/j.envint.2018.11.038](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038).
- [17] Beceiro, A., Tomás, M. & Bou, G. “Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?”, vol. 26, no. 2, pp. 185-230 (2013). doi: [10.1128/CMR.00059-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12).
- [18] Aydın, S., Ince, B., & Ince, O. “Assessment of anaerobic bacterial diversity and its effects on anaerobic system stability and the occurrence of resistance genes during the treatment of pharmaceutical wastewater”, *Bioresour Technol*, vol. 207, pp. 332-338 (2016). doi: [10.1016/j.biortech.2016.01.080](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.080).
- [19] “Research Reports Antimicrobial-Resistant Infections are a Leading Cause of Death Worldwide, Ahead of HIV & Malaria”, <https://www.biomerieuxconnection.com/2022/02/16/research-reports-antimicrobial-resistant-infections-are-a-leading-cause-of-death-worldwide-ahead-of-hiv-malaria/> (accedido a 22 out. 2022).

- [20] “Global Disruption of Antibiotic-Resistant Bacteria”, <https://www.publichealthpost.org/databyte/antibiotic-resistant-bacteria/> (accedido a 22 out. 2022).
- [21] Gaballah, M. S., Guo, J., Sun, H., Aboagye, D., Sobhi, M., Muhmood, A. & Dong, R. “A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook”, *Bioresource Technology*, vol. 333, (2021). doi: 10.1016/j.jiph.2021.10.020.
- [22] Fair, R., J. & Tor, Y. “Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century”, *Perspectives in Medicinal Chemistry*, vol. 6, pp. 25–64, (2014). doi: 10.4137/PMC.S14459.Received.
- [23] “Antibiotics and farming”, <https://www.saveourantibiotics.org/the-issue/antibiotic-overuse-in-livestock-farming/> (accedido a 22 out. 2022).
- [24] Oliver, J. P., Gooch, C. A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., Crossette, E. M. & Aga, D. S. “Invited review: Fate of antibiotic residues , antibiotic-resistant bacteria , and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems”, *J Dairy Sci*, vol. 103, no. 2, pp. 1051–1071, (2020). doi: 10.3168/jds.2019-16778.
- [25] Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M. & Jabes, D. “Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives”, *The Journal of Antibiotics*, vol. 63, pp. 423–430, (2010). doi: 10.1038/ja.2010.62.
- [26] Eliopoulos, G. M. & Huovinen, P. “Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole”, *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, no. 11, pp. 1608-1614, (2001). doi: <https://doi.org/10.1086/320532>.
- [27] Rodríguez, G. A. “Estudio fisicoquímico de soluciones acuosas diluidas de algunas sulfonamidas sódicas estructuralmente relacionadas”, Universidad Nacional de Colombia, (2018).
- [28] Scott, T. & Naqwi, A. “Pharmaceutical salts: Theory, use in solid dosage forms and in situ preparation in an aerosol,” *Asian J Pharm Sci*, vol. 11, no. 6, pp. 722–734, (2016). doi: 10.1016/j.ajps.2016.07.002.
- [29] “Antibiotics groups”, <https://list.essentialmeds.org/antibiotics/> ACCESS (accedido a 25 out. 2022).
- [30] Rosario-Acevedo, R., Biryukov, S. S., Bozue, J. A. & Cote, C. K. “Plague Prevention and Therapy: Perspectives on Current and Future Strategies”, *Biomedicines*, vol. 9, no. 1421, (2021). doi: 10.3390/biomedicines9101421.

- [31] Vardanyan, R. S. & Hruby, V. J. “Sulfonamide drugs and trimethoprim”, *Synthesis of Essential Drugs*, pp. 499–523, (2006).
- [32] Lin, H., Sun, W., Jin, D., Yu, Q., Yang, Y., Zhang, Z., Sun, P. & Ma, J. “Effect of composting on the conjugative transmission of sulfonamide resistance and sulfonamide-resistant bacterial population”, *J Clean Prod*, vol. 285, p. 125483, (2021). doi: 10.1016/j.jclepro.2020.125483.
- [33] Oberoi, A. S. Jia, Y., Zhang, H., Khanal, S. K. & Lu, H. “Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems: A Critical Review”, *Environ Sci Technol*, vol. 53, no. 13, pp. 7234–7264, (2019). doi: 10.1021/acs.est.9b01131.
- [34] Ovung, A. & Bhattacharyya, J. “Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions”, *Biophys Rev*, vol. 13, no. 2, pp. 259–272, (2021). doi: 10.1007/s12551-021-00795-9.
- [35] Henriques, A. G. “A Revisão da Diretiva-Quadro da Água”, *Revista Recursos Hídricos*, vol. 39, no. 2, pp. 15–25, (2018). doi: 10.5894/rh39n2-d1.
- [36] Rao, S. M. & Mamatha, P. “Water quality in sustainable water management”, *Current Science*, vol. 87. no. 7, (2004).
- [37] Kim, S. C. & Carlson, K. “Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices”, *Environ Sci Technol*, vol. 41, no. 1, pp. 50–57, (2007). doi: 10.1021/es060737+.
- [38] Batt, A. L., Bruce, I. B. & Aga, D. S. “Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges”, *Environmental Pollution*, vol. 142, no. 2, pp. 295–302, (2006). doi: 10.1016/j.envpol.2005.10.010.
- [39] Qin, P., Huang, D., Tang, R., Gan, F., Guan, Y. & Lv, X. “Enhanced adsorption of sulfonamide antibiotics in water by modified biochar derived from bagasse”, *Open Chem*, vol. 17, no. 1, pp. 1309–1316, (2019). doi: 10.1515/chem-2019-0141.
- [40] Roy, N., Alex, S. A., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. & Kannabiran, K. “A comprehensive update on antibiotics as an emerging water pollutant and their removal using nano-structured photocatalysts”, *J Environ Chem Eng*, vol. 9, no. 2, p. 104796, (2021). doi: 10.1016/j.jece.2020.104796.
- [41] Drewnowski, J., Remiszewska-Skwarek, A., Duda, S. & Łagód, G. “Aeration process in bioreactors as the main energy consumer in a wastewater treatment plant. Review of solutions and methods of process optimization”, *Processes*, vol. 7, no. 5, (2019). doi: 10.3390/pr7050311.

- [42] Sillanpää, M., Ncibi, M. C. & Matilainen, A. “Advanced oxidation processes for the removal of natural organic matter from drinking water sources: A comprehensive review”, *J Environ Manage*, vol. 208, pp. 56–76, (2018). doi: 10.1016/j.jenvman.2017.12.009.
- [43] León-Buitimea, A., Balderas-Cisneros, F. J., Garza-Cárdenas, C. R., Garza-Cervantes, J. A. & Morones-Ramírez, J. R. “Synthetic Biology Tools for Engineering Microbial Cells to Fight Superbugs,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, (2022). doi: 10.3389/fbioe.2022.869206.
- [44] Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P. “Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance”, *Environ Int*, vol. 124, no. 1, pp. 448–461, (2019). doi: 10.1016/j.envint.2018.12.065.
- [45] “Águas Residuais”, <https://www.cm-castroverde.pt/pt/menu/896/aguas-residuais.aspx> (accedido a 28 out. 2022).
- [46] Henderson, M., Ergas, S. J., Ghebremichael, K., Gross, A. & Ronen, Z. “Occurrence of Antibiotic-Resistant Genes and Bacteria in Household Greywater Treated in Constructed Wetlands”, *Water (Switzerland)*, vol. 14, no. 5, pp. 1–16, (2022). doi: 10.3390/w14050758.
- [47] Russo, V., Hmoudah, M., Broccoli, F., Iesce, M. R., Jung, O. S. & Serio, M. “Applications of Metal Organic Frameworks in Wastewater Treatment: A Review on Adsorption and Photodegradation”, *Frontiers in Chemical Engineering*, vol. 2, no. October, pp. 1–13, (2020). doi: 10.3389/fceng.2020.581487.
- [48] Moni, C., Rumpel, C., Virto, I., Chabbi, A. & Chenu, C. “Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils”, *Eur J Soil Sci*, vol. 61, no. 6, pp. 958–969, (2010). doi: 10.1111/j.1365-2389.2010.01307.x.
- [49] Vareda, J. P. Valente, A. J. M. & Durães, L. “Heavy metals in Iberian soils: Removal by current adsorbents/amendments and prospective for aerogels,” *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 237, pp. 28–42, (2016). doi: 10.1016/j.cis.2016.08.009.
- [50] Pollard, S. J. T., Fowler, G. D., Sollars, C. J. & Perry, R. “Low-cost adsorbents for waste and wastewater treatment: a review”, *Science of the Total Environment*, vol. 116, no. 1–2, pp. 31–52, (1992). doi: 10.1016/0048-9697(92)90363-W.
- [51] Nageeb, M. “Adsorption Technique for the Removal of Organic Pollutants from Water and Wastewater”, *Organic Pollutants - Monitoring, Risk and Treatment*, (2013). doi: 10.5772/54048.
- [52] Saxena, M., Sharma, N. & Saxena, R. “Highly efficient and rapid removal of a toxic dye: Adsorption kinetics, isotherm, and mechanism studies on functionalized multiwalled

- carbon nanotubes”, *Surfaces and Interfaces*, vol. 21, no. June, p. 100639, (2020). doi: 10.1016/j.surfin.2020.100639.
- [53] Muttil, N., Jagadeesan, S., Chanda, A., Duke, M. & Singh, S. K. “Production, Types, and Applications of Activated Carbon Derived from Waste Tyres: An Overview”, *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 13, no. 1, (2023). doi: 10.3390/app13010257.
- [54] Patel, H. “Review on solvent desorption study from exhausted adsorbent,” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 25, no. 8, p. 101302, (2021). doi: 10.1016/j.jscs.2021.101302.
- [55] Gaj, K. “Adsorptive biogas purification from siloxanes-A critical review,” *Energies (Basel)*, vol. 13, no. 10, (2020). doi: 10.3390/en13102605.
- [56] Cova, T. F., Murtinho, D., Aguado, R., Pais, A. A. C. C. & Valente, A. J. M. “Cyclodextrin Polymers and Cyclodextrin-Containing Polysaccharides for Water Remediation”, *Polysaccharides*, vol. 2, no. 1, pp. 16–38, (2021). doi: 10.3390/polysaccharides2010002.
- [57] Steed, J. W. & Atwood, J. L. “Supramolecular Chemistry: Second Edition”, (2009). doi: 10.1002/9780470740880.
- [58] Khan, S. B. & Lee, S. L. “Supramolecular chemistry: Host-guest molecular complexes”, *Molecules*, vol. 26, no. 13, (2021). doi: 10.3390/molecules26133995.
- [59] Saenger, W. “Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry”, *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 19, no. 5, pp. 344–362, (1980). doi: 10.1002/anie.198003441.
- [60] Cheirsilp, B. & Rakmai, J. “Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications”, *Biology, Engineering and Medicine*, vol. 2, no. 1, (2016). doi: 10.15761/BEM.1000108.
- [61] Cram, D. J., & Cram, J. M. “Host-Guest Chemistry”, vol. 183, no. 4127, pp. 803–809, (1974). doi: 10.1126/science.183.4127.803.
- [62] Steed, J. W., Turner, D. R. & Wallace, K. J. “Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry”, *Wiley*, vol. 129, no. 46, (2007).
- [63] Chen, Y., Huang, F. Li, Z. T. & Liu, Y. “Controllable macrocyclic supramolecular assemblies in aqueous solution”, *Science China Chemistry*, vol. 61, no. 8. Science in China Press, pp. 979–992, (2018). doi: 10.1007/s11426-018-9337-4.
- [64] Crini, G. “The contribution of Franz Schardinger to cyclodextrins: a tribute on the occasion of the centenary of his death”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 97, no. 1–2. Springer, pp. 19–28, (2020). doi: 10.1007/s10847-020-00990-3.

- [65] Thoma, J. A. & French, D. “Studies on the Schardinger Dextrins. X. The Interaction of Cyclohexaamylose, Iodine and Iodide. Part I. Spectrophotometric Studies”, vol. 80, pp. 6142–6146 (1958).
- [66] Crini, G. “Review: A history of cyclodextrins”, *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21. American Chemical Society, pp. 10940–10975, (2014). doi: 10.1021/cr500081p.
- [67] Szejtli, J. “ChemInform Abstract: Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry”, *ChemInform*, vol. 29, no. 39, p. 1743-1753, (1998). doi: 10.1002/chin.199839312.
- [68] Pereira, A. G., Carpena, M., Oliveira, P. G., Mejuto, J. C., Prieto, M. A. & Gandara, J. S. “Main applications of cyclodextrins in the food industry as the compounds of choice to form host–guest complexes”, *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 3, (2021). doi: 10.3390/ijms22031339.
- [69] Sandilya, A. A., Natarajan, U. & Priya, M. H. “Molecular View into the Cyclodextrin Cavity: Structure and Hydration”, *ACS Omega*, vol. 5, no. 40, pp. 25655–25667, (2020). doi: 10.1021/acsomega.0c02760.
- [70] Oliveira, R., Santos, D. & Coelho, P. & P. Coelho, “Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica”, *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, vol. 6, pp. 70–83, (2009).
- [71] Del Valle, E. M. M. “Cyclodextrins and their uses: A review”, *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 9, pp. 1033–1046, (2004). doi: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
- [72] Saenger, W., Jacob, J., Gessler, K., Steiner, T., Hoffmann, D., Sanbe, H., Koizumi, K., Smith, S. M., Takaha, T. “Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues - beyond the doughnut”, *Chem Rev*, vol. 98, no. 5, pp. 1787–1802, (1998). doi: 10.1021/cr9700181.
- [73] Gómez-Morte, T., Gómez-Morte, V. M., Lucas-Abellán, C., Martínez-Alcalá, I., Ayuso, M., Martínez-López, S., Montemurro, N., Pérez, S., Barveló, D., Fini, P., Cosma, P., Cerón-Carrasco, J. P., Fortea, M. I., Núñez-Delicado, E. & Gabaldón, J. A. “Removal and toxicity evaluation of a diverse group of drugs from water by a cyclodextrin polymer/pulsed light system”, *J Hazard Mater*, vol. 402, (2021). doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123504.
- [74] Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J. C., Simal-Gandara, J. & Astray, G. “Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications”, *Food Chemistry*, vol. 384, (2022). doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132467.
- [75] Suvarna, V., Singh, V., Sharma, D. & Murahari, M. “Experimental and computational insight of the supramolecular complexes of Irbesartan with β -cyclodextrin based

- nanosponges”, *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 63, p. 102494, (2021). doi: 10.1016/j.jddst.2021.102494.
- [76] Aguiar, U. N., Lima, S., Rocha, M. S. & Freitas, R. M. “Preparation and characterization of the inclusion complex essential oil of croton zehntneri with β -cyclodextrin”, *Quim Nova*, vol. 37, no. 1, (2014). doi: 10.1590/S0100-40422014000100010.
- [77] Singh, V. “Ordered and disordered cyclodextrin nanosponges with diverse physicochemical properties,” *RSC Adv*, vol. 7, no. 38, pp. 23759–23764, (2017). doi: 10.1039/c7ra00584a.
- [78] Utzeri, G., Matias, P. M. C., Murtinho, D., & Valente, A. J. M. “Cyclodextrin-Based Nanosponges: Overview and Opportunities,” *Front Chem*, vol. 10, (2022). doi: 10.3389/fchem.2022.859406.
- [79] A. Catarina, M. Paixão, and A. R. Figueiras, “Cyclodextrins as a new therapeutic approach to drug delivery in the colon”, *Boletim Informativo Geum*, vol. 7, no. 4, (2016).
- [80] P. Mura, “Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 113, pp. 226–238, (2015). doi: 10.1016/j.jpba.2015.01.058.
- [81] Mura, P. “Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 101, pp. 238–250, (2014). doi: 10.1016/j.jpba.2014.02.022.
- [82] Yan, X., Wang, Y., Meng, T. & Yan, H. “Computational Insights Into the Influence of Substitution Groups on the Inclusion Complexation of β -Cyclodextrin,” *Front Chem*, vol. 9, (2021). doi: 10.3389/fchem.2021.668400.
- [83] Cova, T. F. G. G., Murtinho, D., Pais, A. A. C. C. & Valente, A. J. M. “Cyclodextrin-based Materials for Removing Micropollutants From Wastewater”, *Current Organics Chemistry*, vol. 22, no. 22., pp. 2150–2181, (2018). doi: 10.2174/1385272822666181019125315.
- [84] Krabicová, I., Appleton, S. L., Tannous, M., Hoti, G., Caldera, F., Pedrazzo, A. R., Cecone, C., Cavalli, R. & Trotta, F. “History of cyclodextrin nanosponges”, *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 5, pp. 1–23, (2020). doi: 10.3390/POLYM12051122.
- [85] Sherje, A. P., Dravyakar, B. R., Kadam, D. & Jadhav, M. “Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review”, *Carbohydr Polym*, vol. 173, pp. 37–49, (2017). doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.086.
- [86] Sherje, A. P., Dravyakar, B. R., Kadam, D. & Jadhav, M. “Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 173. Elsevier Ltd, pp. 37–49, (2017). doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.086.

- [87] Caldera, F., Tannous, M., Cavalli, R., Zanetti, M. & Trotta, F. “Evolution of Cyclodextrin Nanosponges”, *Int J Pharm*, vol. 531, no. 2, pp. 470–479, (2017). doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.072.
- [88] Agaoglu, B., Coptý, N. K., Scheytt, T. & Hinkelmann, R. “Interphase mass transfer between fluids in subsurface formations: A review”, vol. 79, pp. 162.194, (2015). doi: <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.02.009>.
- [89] Wei, C. & Liu, S. “Determination of diffusion coefficient and convective heat transfer coefficient for non-isothermal desorption-diffusion of gas from coal particles”, *Fuel*, vol. 352, pp. 129–144, (2023). doi: 10.1016/j.fuel.2023.129144.
- [90] Tyrrell, H. J. V. & Harris, K. R. “Diffusion in Liquids. Transport processes: some general principles”, *Elsevier*, (1984). doi: 10.1016/b978-0-408-17591-3.50005-8.
- [91] Allnat, A. R. “Transport Properties of Fluids: Their Correlation, Prediction and Estimation”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 119, no. 25, (1997). doi: <https://doi.org/10.1021/ja965733r>.
- [92] Muñoz-Chicharoo, A., Votapka, L. W., Amaro, R. E. & Wade, R. C. “Brownian dynamics simulations of biomolecular diffusional association processes”, *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 13, no. 3, (2022). doi: <https://doi.org/10.1002/wcms.1649>.
- [93] Philibert, J. “One and a Half Century of Diffusion: Fick, Einstein, Before and Beyond”, *Diffusion Fundamentals*, vol. 6, (2006).
- [94] Paul, A., Laurila, T., Vuorinen, V. & Divinski, S. V. “Thermodynamics, Diffusion and the Kirkendall Effect in Solids”, *Springer*, pp. 115–139, (2014).
- [95] Robinson, R. A. & Stokes, R. H. “SOLUTIONS OF ELECTROLYTES AND DIFFUSION IN LIQUIDS”, *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 8, pp. 37-54, (1957). doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.08.100157.000345>.
- [96] Tyrrell, H. J. V. “The Origin and Present Status of Fick’s Diffusion Law”, *Journal of Chemical Education*, vol. 41, no. 7, (1964) doi: <https://doi.org/10.1021/ed041p397>.
- [97] Taylor, G. I. “Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube,” *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*, vol. 219, no. 1137, pp. 186–203, (1953). doi: 10.1098/rspa.1953.0139.
- [98] Aris, R. “On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube”, *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*, vol. 235, no. 1200, pp. 67–77, (1956). doi: 10.1098/rspa.1956.0065.

- [99] Baldauf, W. & Knapp, H. “Measurements of diffusivities in liquid by the dispersion method”, *Chemical Engineering Science*, vol. 38, no. 7, pp. 1031-1037, (1983). doi: [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(83\)80024-4](https://doi.org/10.1016/0009-2509(83)80024-4).
- [100] Mendes, F. S., Cruz, C. E. M., Martins, R. N., Ramalho, J. P. P. & Martins, L. F. G. “On the diffusion of ketoprofen and ibuprofen in water: An experimental and theoretical approach”, *Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 178, (2023). doi: 10.1016/j.jct.2022.106955.
- [101] Sechenyh, V., Legros, J. C. & Shevtsona, V. “Development and validation of a new setup for measurements of diffusion coefficients in ternary mixtures using the Taylor dispersion technique”, *Comptes Rendus Mécanique*, vol. 341, pp. 490-496, (2013). doi: <https://doi.org/10.1016/j.crme.2013.02.004>.
- [102] Alizadeh, A., Castro, C. A. N. & Wakeham, W. A. “The Theory of the Taylor Dispersion Technique for Liquid Diffusivity Measurements”, *International Journal of Thermophysics*, vol. 1, no. 3, pp. 243–284, (1980).
- [103] Ramos, M. L., Dias, D. C., Justino, L. L. G., Verissimo, L. M. P., Valente, A. J. M., Estes, M. A., Ribeiro, A. C. F., Leais, D. G., Pina, J., Cabral, A. M. T. D. P. V. & Rodrigo, M. M. “Interactions between glycyl-L-phenylalanine and β -cyclodextrin from diffusion, spectroscopic and computational studies”, *J Mol Liq*, vol. 315, (2020). doi: 10.1016/j.molliq.2020.113704.
- [104] Whitaker, S. “Simultaneous Heat, Mass, and Momentum Transfer in Porous Media: A Theory of Drying”, *Elsevier*, vol. 13, pp. 199–203 (1977).
- [105] Ribeiro, A. C. F., Valente, A. J. M., Santos, C. I. A. V., Prazeres, P. M. R. A., Lobo, V. M. M., Burrows, H. D., Estes, M. A., Cabral, A. M. T. D. P. V. & Veiga, F. J. B. “Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of α -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin, and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin at temperatures from (298.15 to 312.15) K”, *J Chem Eng Data*, vol. 52, no. 2, pp. 586–590, (2007). doi: 10.1021/je060474z.
- [106] Ribeiro A. C. F., Ramos, M. L., Burrows, H. D., Estes, M. A. “Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of β -cyclodextrin at temperatures from 298.15 to 312.15 K”, *J Chem Eng Data*, vol. 51, no. 4, pp. 1368–1371, (2006). doi: 10.1021/je060092t.
- [107] Ribeiro, A. C. F., Santos, C. I. A. V., Valente, A. J. M., Ascenso, O. S., Lobo, V. M. M., Burrows, H. D., Cabral, A. M. T. D. P. V., Veiga, F. J. B., Teijeiro, C. & Estes, M. A. “Some transport properties of γ -cyclodextrin aqueous solutions at (298.15 and 310.15) K”, *J Chem Eng Data*, vol. 53, no. 3, pp. 755–759, (2008). doi: 10.1021/je700598v.

- [108] Lobo, V. M. M., Ribeiro, A. C. F. & Verissimo, L. M. “Diffusion Coefficients in Aqueous Solutions of Beryllium Sulfate at 298 K”, *J Chem Eng Data*, vol. 39, no. 4, pp. 726–728, (1994). doi: 10.1021/je00016a020.
- [109] Paduano, L., Sartorio, R. & Vitagliano, V. “Diffusion Coefficients of the Ternary System α -Cyclodextrin-Sodium Benzenesulfonate-Water at 25 °C: The Effect of Chemical Equilibrium and Complex Formation on the Diffusion Coefficients of a Ternary System”, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, no. 25, pp. 5023–5028, (1998). doi: <https://doi.org/10.1021/jp972356b>.
- [110] Eigen, M. & Maeyer, L. “Self-dissociation and protonic charge transport in water and Ice”, *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*, vol. 247, no. 1251, pp. 505–533, (1958). doi: 10.1098/rspa.1958.0208.
- [111] Galindres, D. M., Ribeiro, A. C. F., Valente, A. J. M., Estes, M. A., Sanabria, E., Vargas, E. F., Verissimo, L. M. P. & Leait, D. G. “Ionic conductivities and diffusion coefficients of alkyl substituted sulfonated resorcinarenes in aqueous solutions”, *Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 133, pp. 223–228, (2019). doi: 10.1016/j.jct.2019.02.018.
- [112] Ren, G. “The effective hydrodynamic radius is not a constant”, (2022). doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2201.05804>.
- [113] Akash, M. S. H. & Rehman, K. “Essentials of Pharmaceutical Analysis”, *Springer Singapore*, (2019). doi: 10.1007/978-981-15-1547-7.
- [114] Ricci, R. W., Ditzler, M. & Nestor, L. P. “Discovering the Beer–Lambert Law”, *Journal of Chemical Education*, vol. 71, no. 11, (1994). doi: <https://doi.org/10.1021/ed071p983>.
- [115] Hargis, L. G., Howell, J. A. & Sutton, R. E. “Ultraviolet and Light Absorption Spectrometry”, *Analytical Chemistry*, vol. 68, no. 12, pp. 169–184, (1996). doi: <https://doi.org/10.1021/a19600101>
- [116] Vogt, C., Wondergem, C. S. & Weckhuysen, B. M. “Ultraviolet–Visible (UV-Vis) Spectroscopy”, *Springer*, pp. 237–264, (2023). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-031-07125-6_11.
- [117] Guo, Y., Liu, C., Ye, R. & Duan, Q. “Advances on Water Quality Detection by UV–Vis Spectroscopy”, *Applied Sciences*, vol. 10, no. 19, (2020). doi: <https://doi.org/10.3390/app10196874>.
- [118] Ebel, S. & Karger, A. “Precision of Parameters Determined by Spectrophotometric Measurements: Part 1. Precision of the 1: 1 α -Cyclodextrin Ligand-Binding Constant as Obtained by Spectrophotometric Determination”, *Elsevier Science Publishers B.V.*, vol. 6, no. 4, pp. 301–311, (1989). doi: [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(89\)80099-1](https://doi.org/10.1016/0169-7439(89)80099-1).

- [119] Sambasevam, K. P., Mohamad, S., Sarih, N. M. & Ismail, N. A. “Synthesis and characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin and azomethine”, *Int J Mol Sci*, vol. 14, no. 2, pp. 3671–3682, (2013). doi: 10.3390/ijms14023671.
- [120] Yang, C., Liu, L., Um, T. W. & Guo, Q. X. “The Performance of the Benesi–Hildebrand Method in Measuring Constants of the Cyclodextrin Complexation”, *The Japan Society for Analytical Chemistry*, vol. 16, pp. 537–539, (2000). doi: 10.2116/analsci.16.537.
- [121] Valente, A. J. M. & Söderman, O. “The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins”, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 205, pp. 156–176, (2014). doi: 10.1016/j.cis.2013.08.001.
- [122] Leyva, E., Moctezuma, E., Loredó–Carrillo, S. E., Espinosa-González, C. G. & Cárdenas-Chaparro, A. “Determination of the structure of quinolone- γ -cyclodextrin complexes and their binding constants by means of UV–Vis and ^1H NMR”, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, vol. 91, no. 3–4, pp. 211–218, (2018). doi: 10.1007/s10847-018-0817-x.
- [123] Gonsalves A. M. d’A. R. & Melo, T. M. Y. D. P. “Espectroscopia de ressonância magnética nuclear”, *Imprensa da Universidade de Coimbra*, (2016). doi: 10.14195/978-989-26-0357-5.
- [124] Mazurek, A. H. & Szeleszczuk, Ł. “A Review of Applications of Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR) for the Analysis of Cyclodextrin-Including Systems”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 4. MDPI, (2023). doi: 10.3390/ijms24043648.
- [125] Kumar, D., Krishnan, Y., Paranjothy, M. & Pal, S. “Determination of inclusion geometry of cyclodextrin host-guest complexes: Applicability of 1D selective NMR methods”, *J Magn Reson Open*, vol. 10–11, p. 100053, (2022). doi: 10.1016/j.jmro.2022.100053.
- [126] El-Sheshtawy, H. S., Chatterjee, S., Assaf, K. I., Shinde, M. N., Nau, W. M. & Mohanty, J. “A Supramolecular Approach for Enhanced Antibacterial Activity and Extended Shelf-life of Fluoroquinolone Drugs with Cucurbit[7]uril”, *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, (2018). doi: 10.1038/s41598-018-32312-6.
- [127] Jahed, V., Zarrabi, A., Bordbar, A. K. & Hafezi, M. S. “NMR (^1H , ROESY) spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of β -cyclodextrin and curcumin”, *Food Chem*, vol. 165, pp. 241–246, (2014). doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.094.

- [128] Bouchemal, K. & Mazzaferro, S. “How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions”, *Drug Discovery Today*, vol. 17, no. 11–12, pp. 623–629, (2012). doi: 10.1016/j.drudis.2012.01.023.
- [129] Wadsö, L. “The Isothermal Heat Conduction Calorimeter: A Versatile Instrument for Studying Processes in Physics, Chemistry, and Biology”, *Journal of Chemical Education*, vol. 78, no. 8, pp. 1080–1086, (2001).
- [130] Schmidtchen, F. P. “Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry”, in *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, (2012). doi: 10.1002/9780470661345.smc024.
- [131] Freyer, M. W. & Lewis, E. A. “Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions”, *Methods in Cell Biology*, vol. 84, pp. 79–113, (2008). doi: 10.1016/S0091-679X(07)84004-0.
- [132] Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. “On the Value of c : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?”, *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 48, pp. 14859–14866, (2003). doi: 10.1021/ja036166s.
- [133] Hazra, S. & Kumar, G. S. “Physicochemical properties of inclusion complexes of sanguinarine with natural cyclodextrins: Spectroscopy, calorimetry and NMR studies”, *RSC Adv*, vol. 5, no. 3, pp. 1873–1882, (2015). doi: 10.1039/c4ra10204e.
- [134] Utzeri, G., Murtinho, D., Maria, T. M. R., Pais, A. A. C. C., Sannino, F. & Valente, A. J. M. “Amine- β -cyclodextrin-based nanosponges. The role of cyclodextrin amphiphilicity in the imidacloprid uptake”, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 635, p. 128044, (2022). doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.128044.
- [135] Bani-Yaseen, A. & Mo’Ala, A. “Spectral, thermal, and molecular modeling studies on the encapsulation of selected sulfonamide drugs in β -cyclodextrin nano-cavity”, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 131, pp. 424–431, (2014). doi: 10.1016/j.saa.2014.04.136.
- [136] Rogez-Florent, T., Azaroual, N., Goossens, L., Goossens, J. F. & Danel, C. “NMR investigation of the complexation and chiral discrimination of pyrazole sulfonamide derivatives with cyclodextrins”, *Carbohydr Polym*, vol. 115, pp. 598–604, (2015). doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.046.
- [137] Saha, S., Roy, A., & Roy, M. N. “Mechanistic Investigation of Inclusion Complexes of a Sulfa Drug with α - And β -Cyclodextrins”, *Ind Eng Chem Res*, vol. 56, no. 41, pp. 11672–11683, (2017). doi: 10.1021/acs.iecr.7b02619.

- [138] Fenyvesi, É. & Puskás, I. “Effect of inorganic salts on the inclusion complex formation and solubilizing potency of cyclodextrins”, (2017).