



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Programa de Pós-graduação em Química



DAYSILA FERNANDA MOREIRA NAVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMERO DE IMPRESSÃO IÔNICA DE
ACESSO RESTRITO PARA DETERMINAÇÃO *ON-LINE* DE COBRE EM
LEITE**

Alfenas/MG

2022

DAYSILA FERNANDA MOREIRA NAVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMERO DE IMPRESSÃO IÔNICA DE
ACESSO RESTRITO PARA DETERMINAÇÃO *ON-LINE* DE COBRE EM
LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Mariane Gonçalves Santos

Alfenas/MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Naves, Daysla Fernanda Moreira

N323s Síntese e caracterização de polímero de impressão iônica de acesso restrito para determinação on-line de cobre em leite. / Daysla Fernanda Moreira Naves – Alfenas, MG, 2022.
80 f.: il. –

Orientadora: Mariane Gonçalves Santos.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2022.
Bibliografia.

1. Materiais de acesso restrito. 2. Polímeros de impressão iônica.
3. Polímero de impressão iônica de acesso restrito. 4. FIA- FAAS.
5. Cobre. I. Santos, Mariane Gonçalves II. Título.

CDD- 543

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

DAYSLA FERNANDA MOREIRA NAVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMERO DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO
PARA ANÁLISE ON-LINE DE COBRE EM LEITE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 27 de janeiro de 2022

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereria Filho
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos, Professor do Magistério Superior**, em 27/01/2022, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 27/01/2022, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edenir Rodrigues Pereira Filho, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0667380** e o código CRC **6CA0484E**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por sempre me amparar, guiar e proteger. Por iluminar meu caminho e dar forças para lidar com momentos difíceis e superar obstáculos e medos. Tudo o que eu tenho, devo a Ele.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Mariane Gonçalves Santos, por confiar em mim e ter aceitado ser minha orientadora, por ser tão solícita, pela ajuda e ensinamentos, pela positividade, compreensão e preocupação.

Aos meus pais: Andréia e Sebastião, sem eles eu não conseguiria chegar aonde cheguei. Obrigada pelo esforço que fazem por mim, para me ver bem, por todo incentivo para eu correr atrás meus sonhos e por sempre me apoiarem em tudo.

Aos meus avós queridos: Toninha e Caquinho, Dita e Tião, que são responsáveis pelos ensinamentos que tenho na vida, por se preocuparem comigo, por me incentivarem e principalmente por terem orgulho da pessoa que me tornei.

Aos meus queridos amigos que estão presentes em toda a minha trajetória, tornando-a mais divertida e leve, além de me ajudar quando precisei, por me dar conselhos e me acolher nos momentos difíceis. Obrigada pelas risadas de sempre e eu não sei o que faria sem vocês ao meu lado, principalmente o Eduardo, Fabrício e Cristiane que me ajudaram muito durante meu mestrado. Ao meu namorado Patrick, por toda sua paciência, amor, companheirismo e por me incentivar sempre.

Quero agradecer aos laboratórios LACFar, LATF e ao GPQAI por me fornecerem toda acomodação e material necessário para essa pesquisa acontecer.

Por último quero agradecer à UNIFAL-MG, ao programa de pós-graduação em química e a todos os órgãos de fomentos, CAPES, FAPEMIG e CNPQ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A determinação de compostos inorgânicos em amostras biológicas complexas, como o leite, requer a utilização de técnicas que sejam capazes de apresentar resultados com alta sensibilidade e seletividade. Neste sentido, a utilização dos polímeros de impressão iônica de acesso restrito (RAIIPs) para extração em fase sólida (SPE) de metais, associado à espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) em sistema de análise em fluxo (FIA), é uma boa alternativa para minimizar os efeitos de interferência, permitir a separação e pré-concentração *on-line* das amostras, além de possibilitar o uso de quantidades menores de volumes de amostra e reagentes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar a síntese e caracterização de um RAIIP seletivo a Cu^{2+} para ser empregado em um sistema FIA-FAAS para a análise *on-line* deste íon em amostras de leite. O RAIIP foi sintetizado pelo método *in bulk*, utilizando Cu^{2+} como *template*, 4-vinilpiridina como monômero funcional, glicidil metacrilato como co-monômero hidrofílico, etilenoglicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada, o 4,4 – azorbis (ácido 4-cianoaléico) como iniciador radicalar e acetonitrila como solvente. Após a síntese, foi realizado o processo de abertura do anel epóxido para a geração de grupamentos hidroxila na superfície do material, obtendo-se um RAIIP e posteriormente, foi feito o revestimento com albumina sérica bovina, gerando o RAIIP-BSA. O material sintetizado foi caracterizado por meio da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (e termogravimetria para atestar a eficiência da síntese e do revestimento com BSA. Após a caracterização, o RAIIP-BSA foi utilizado na SPE *on-line* de cobre em amostras de leite. As principais variáveis da extração foram otimizadas, sendo as melhores condições: pH da amostra: 7,0; volume da amostra: 20 mL, vazão de pré-concentração e eluição: $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e eluente: $\text{HCl } 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A cinética de adsorção mostrou que o equilíbrio de adsorção é alcançado em 10 min e que o modelo não linear que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de pseudo-primeira ordem, sendo um processo de fisissorção, ou seja, atração eletrostática entre os íons de Cu^{2+} e RAIIP-BSA. A isoterma de adsorção, por sua vez, foi melhor ajustada ao modelo de Sips, sendo uma combinação das isotermas de Langmuir e Freundlich. Por meio dos testes de seletividade, foi possível concluir que o RAIIP-BSA apresenta seletividade melhorada ao íon de interesse. O método foi validado, apresentando boas figuras de mérito, como faixa linear de 0,05 a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, LoD e LoQ de 0,03 e $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, precisão intra e inter-dias

variando de 0,73 a 4,14% e 0,16 a 3,68%, respectivamente, e exatidão intra e inter-dias variando de 97,0 a 115,0% e 103,0 a 119% respectivamente. Todas as amostras de leite analisadas estavam dentro dos limites estabelecidos pelas legislações internacionais e nacionais. Além disso, o método proposto é capaz de determinar concentrações de elementos traços com boa exatidão e precisão.

Palavras-chaves: Materiais de acesso restrito; Polímeros de impressão iônica; Polímero de impressão iônica de acesso restrito; FIA- FAAS; Cobre.

ABSTRACT

The determination of inorganic compounds in complex biological samples, such as milk, requires the use of techniques that are capable of presenting results with high sensitivity and selectivity. In this sense, the use of restricted access ion impression polymers (RAIIPs) for solid phase extraction (SPE) of metals, associated with flame atomic absorption spectrometry (FAAS) in a flow analysis system (FIA), is a good alternative to minimize interference effects, allow on-line separation and pre-concentration of samples, in addition to allowing the use of smaller amounts of sample volumes and reagents. Thus, this work aimed to carry out the synthesis and characterization of a Cu^{2+} selective RAIIP to be used in an FIA-FAAS system for the online analysis of this ion in milk samples. RAIIP was synthesized by the bulk method, using Cu^{2+} as template, 4-vinylpyridine as functional monomer, glycidyl methacrylate as hydrophilic co-monomer, ethylene glycol dimethacrylate as cross-linking agent, 4,4-azobis (4-cyanovaleric acid) as radical initiator and acetonitrile as solvent. After the synthesis, the epoxide ring opening process was carried out to generate hydroxyl groups on the surface of the material, obtaining a RAIIP and later, the coating with bovine serum albumin was carried out, generating the RAIIP-BSA. The synthesized material was characterized by means of Fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetry to attest to the efficiency of synthesis and coating with BSA. After characterization, RAIIP-BSA was used in the on-line SPE of copper in copper samples. The main variables of extraction were optimized, with the best conditions being: sample pH: 7.0; sample volume: 20 mL, pre-concentration and elution flow rate: $5.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and eluent: $\text{HCl } 1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The adsorption kinetics showed that the adsorption equilibrium is reached in 10 min and that the nonlinear model that best fit the experimental data was the pseudo-first order, being a physisorption process, that is, electrostatic attraction between Cu^{2+} ions and RAIIP-BSA. The adsorption isotherm, in turn, was better adjusted to the Sips model, being a combination of the Langmuir and Freundlich isotherms. Through the selectivity tests, it was possible to conclude that the RAIIP-BSA shows improved selectivity to the ion of interest. The method was validated, showing good figures of merit, such as a linear range of 0.05 to $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, LoD and LoQ of 0.03 and $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, intra and inter- days ranging from 0.73 to 4.14% and 0.16 to 3.68% , respectively, and intra and inter-day accuracy ranging from 97.0 to 115.0% and 103.0 to 119% respectively. All milk samples analyzed were within the limits established

by international and national legislation. Furthermore, the proposed method is capable of determining trace element concentrations with good accuracy and precision.

Keywords: Restricted access materials; Ionic imprint polymers; Restricted Access Ion Printing Polymer; FIA- FAAS; Copper.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxo normal de cobre no corpo humano.....	21
Figura 2 -	Comportamento do cobre no organismo.....	22
Figura 3 -	Esquema do espectrômetro de absorção atômica com chama.....	24
Figura 4 -	Representação da síntese de um IIP.....	28
Figura 5 -	Esquema da polimerização in bulk.....	30
Figura 6 -	Mecanismo de exclusão de macromoléculas pelo RAM.....	32
Figura 7 -	Classificação dos sorventes em relação ao seu tipo de barreira poros....	33
Figura 8 -	Esquema de síntese do RAIP-BSA.....	35
Figura 9 -	Representação esquemática do sistema FIA-FAAS.....	43
Figura 10 -	Esquema de reações que ocorrem no processo de revestimento com BSA	50
Figura 11 -	Esquema de síntese do RAIP-BSA.....	51
Figura 12 -	Espectros de FT-IR para RAIP e RAIP-BSA.....	51
Figura 13 -	Curvas de perda de massa para RAIP e RAIP-BSA.....	52
Figura 14 -	Cinéticas de adsorção do RAIP-BSA adequadas aos modelos de pseudo- primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.....	55
Figura 15 -	Isotermas de adsorção do RAIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich Peterson.....	57
Figura 16 -	Otimização univariada para diluição da amostra.....	58
Figura 17 -	Otimização univariada para volume da amostra.....	59
Figura 18 -	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para as variáveis do sistema de determinação on-line de cobre em leite.....	61
Figura 19 -	Superfície de resposta da C.E x VP.....	63
Figura 20 -	Superfície de resposta para VP x pH.....	63
Figura 21 -	Superfície de resposta para CE x pH.....	64
Figura 22 -	Efeito dos íons concomitantes na recuperação do sinal analítico de Cu^{2+} para RAIP-BSA e RANIP-BSA.....	65
Figura 23 -	Curva de calibração para o sistema de pré-concentração em coluna...	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Monômeros funcionais mais utilizados	29
Tabela 2 -	Planejamento fatorial para 2 fatores	37
Tabela 3 -	Valores do planejamento fatorial para três variáveis.....	46
Tabela 4 -	Níveis codificados e reais da Matriz de Doehlert para 3 fatores empregada na otimização do sistema de pré-concentração on-line de Cu^{2+} em fibra RAIP-BSA.....	46
Tabela 5 -	Parâmetros cinéticos para adsorção de Cu^{2+} em RAIP-BSA ajustado para os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.....	54
Tabela 6 -	Parâmetros das isotermas de adsorção de cobre em RAIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich Peterson.....	56
Tabela 7 -	Resultados do planejamento fatorial para três variáveis.....	60
Tabela 8 -	Matriz de Doehlert com 3 fatores para a otimização do sistema de pré-concentração on-line de Cu^{2+} em RAIP-BSA	62
Tabela 9 -	Figuras de mérito	68
Tabela 10 -	Concentração de Cu^{2+} encontrada em amostras de leite do comércio de Alfenas e região.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A4-C4	4,4 - Azorbis (4- ácido cianoaléxico)
AAS	Espectrometria de absorção atômica. Do inglês: <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
ALC	Agente de ligação cruzada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina sérica bovina. Do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CE	Concentração do eluente
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama. Do inglês: <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FIA	Análise por injeção em fluxo. Do inglês: <i>Flow Injection Analysis</i>
FIA-FAAS	Sistema de análise por injeção em fluxo acoplado à espectrofotômetro de absorção atômica com chama
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Do inglês: <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Do inglês: <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GMA	Glicidil metacrilato.
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência. Do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente. Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente. Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
IDR	Ingestão diária recomendada
IIP	Polímero de impressão iônica. Do inglês: <i>Ion Imprinted Polymer.</i>
IR	Iniciador radicalar
LoD	Limite de detecção
LoQ	Limite de quantificação
MF	Monômero funcional

MM	Molécula modelo
MIP	Polímero de impressão molecular. Do inglês: <i>Molecular Imprinted Polymer</i>
NIP	Polímero não impresso. Do inglês: <i>Non Imprinted Polymer</i>
OM	Otimização Multivariada
OU	Otimização Univariada
RAM	Material de acesso restrito, do inglês: <i>Restricted Access Material</i> .
RAIIP	Polímero de impressão iônica de acesso restrito. Do inglês: <i>Restricted Access Ionic Imprinted Polymer</i>
RANIP	Polímero não impresso de acesso restrito. Do inglês: <i>Restricted Access Unprinted Polymer</i>
RAIIP – BSA	Polímero de impressão iônica de acesso restrito revestido com albumina sérica bovina.
RANIP-BSA	Polímero não impresso de acesso restrito revestido com albumina sérica bovina.
SPE	Extração em fase sólida. Do inglês: <i>Solid Phase Extraction</i>
VP	Vazão de pré-concentração.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	O ELEMENTO COBRE	20
2.1.2	Cobre no corpo humano.....	20
2.2	TÉCNICAS E MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	22
2.2.1	Espectrometria de absorção atômica	23
2.2.2	Análise por injeção em fluxo	24
2.2.2.1	Sistema FIA acoplado à FAAS (FIA-FAAS)	25
2.2.3	Determinação de cobre em amostras complexas	26
2.3	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA	27
2.4	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO	31
2.5	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO.....	34
2.6	OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS	35
2.6.1	Planejamento fatorial completo	36
2.6.2	Matriz de Doehlert	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Geral	39
3.2	Específicos	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	40
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	40
4.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP-BSA)	41

4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP)	42
4.4.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	42
4.4.2	Análise Térmica	42
4.5	SISTEMA FIA-FAAS PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DE COBRE EM LEITE	43
4.6	CINÉTICA E ISORTERMA DE ADSORÇÃO	44
4.7	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	45
4.8	AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO	47
4.9	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	47
5	RESULTADOS	49
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP-BSA)	49
5.2	CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO	53
5.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	57
5.4	ESTUDOS DA SELETIVIDADE DO MÉTODO	65
5.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	66
5.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	68
6	CONCLUSÃO	70
	REFERENCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A criação de gado, também chamada de bovinocultura, é uma das maiores atividades econômicas que se tem no Brasil, gerando cerca de 76 bilhões de reais por ano¹. Segundo o censo agropecuário de 2019 do IBGE² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o rebanho bovino brasileiro possui aproximadamente 215 milhões de cabeças e é considerado o segundo maior do mundo. Além disso, ocupa o quarto lugar de produção de leite no ranking mundial – 34 bilhões de litros - sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor nacional - 8,9 bilhões de litros em 2019.³

O consumo de leite iniciou há cerca de 11 mil anos no Oriente Médio e o Brasil ocupa hoje a 65ª posição mundial, com média anual de 169 litros/pessoa, sendo essa média abaixo do estabelecido pela ONU – Organização das Nações Unidas: 200-220 litros/pessoa⁴. Este alimento é constituído por diversos elementos sólidos que têm elevado valor nutricional como: lipídios, carboidratos, proteínas que ajudam na regeneração, fortalecimento e crescimento dos músculos, sais minerais e vitaminas. A quantidade desses nutrientes depende diretamente da nutrição da vaca, podendo conter valores mais altos ou mais baixos. Dentre os minerais mais comuns encontram-se o cálcio, fósforo e potássio, mas é possível também encontrar traços de outros minerais como o cobre que apresenta uma quantidade em torno de 0,13 mg. L⁻¹. A presença de cobre no leite varia em função das condições ambientais, práticas tecnológicas e uso desordenado de produtos químicos.⁵

O cobre é um metal traço essencial que foi descoberto por volta de 8.500 a.C.⁶ Foi o primeiro metal extraído e trabalhado pelo homem. É amplamente utilizado em indústrias metalúrgicas, como na produção de ligas metálicas, condutores de eletricidade e moedas. Seus sais podem ser utilizados em fogos de artifícios e no combate à micro-organismos presentes em plantas. É também chamado de oligoelemento, que em baixas concentrações é importante em diversos processos fisiológicos e biológicos do corpo humano. Nos seres humanos, ele está distribuído por todo o organismo, sendo mais comum nos rins e fígado. Segundo a ANVISA⁷-Agência Nacional de Vigilância Sanitária, seu IDR - Ingestão Diária Recomendada - é de 0,90 mg para adultos e 0,44 mg para crianças. Mas, apesar de ser um oligoelemento, em níveis acima do recomendado, o cobre torna-se tóxico e pode causar doenças como a cirrose infantil e doença de Wilson.⁸⁻¹¹

O Ministério da Saúde brasileiro, permite um valor máximo de 2,0 mg. L⁻¹ de cobre em leite¹², enquanto que a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) e a Organização de Comércio Exterior do Japão (JETRO), estabelecem valores bem menores: 0,3 e 0,6 mg.L⁻¹, respectivamente.¹⁰ Contudo, mesmo com limites máximos estabelecidos, o monitoramento de cobre nesses alimentos torna-se imprescindível, pois, com o desordenado de produtos agrícolas, práticas tecnológicas e condições ambientais⁵, concentrações maiores que o permitido podem ser encontradas, ocasionando problemas graves de saúde.

A determinação de cobre em leite é uma tarefa desafiadora, pois o leite apresenta uma matriz complexa e para que haja sucesso das análises, são demandados alguns cuidados especiais como um preparo amostra que minimize a interferência de concomitantes e o uso de técnicas analíticas que permitam a determinação de concentrações diminutas do analito de interesse, como o cobre.¹¹

Uma técnica comumente utilizada na determinação de metais e elementos de baixas concentrações é a espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: *Flame Atomic Absorption Spectrometry* - FAAS), que apresenta algumas vantagens frente às técnicas multielementares, como a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* - ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* - ICP-OES), como o menor custo do equipamento, menor custo operacional e facilidade de operação.¹³ Ademais, a FAAS pode ser associada aos sistemas de injeção por análise em fluxo (do inglês: *Flow injection analysis* - FIA). Com esses sistemas, há um baixo consumo de reagente e amostra, boa precisão e as análises podem ser realizadas em um sistema fechado, sendo menos suscetível às contaminações. Com a combinação entre eles (FIA-FAAS), os efeitos de interferência são minimizados, além de permitir a separação e pré-concentração *on-line* dos analitos.¹⁴

Em relação ao preparo de amostras, as principais estratégias empregadas para a determinação de metais em matrizes complexas são a decomposição por via seca e úmida. Tais estratégias apresentam alguns inconvenientes como risco de contaminação, necessidade de utilizar grandes volumes de reagentes e processos morosos. Neste sentido, técnicas de extração em fase sólida que empregam sorventes multifuncionais, têm sido bastante exploradas para minimizar os inconvenientes relacionados aos procedimentos tradicionais de preparo.¹⁵

Os materiais de acesso restrito (do inglês: *Restricted Access Materials* – RAM), são uma classe de sorventes que apresentam grandes potencialidades para o preparo de amostras complexas visando a determinação de metais. Sua utilização apresenta as vantagens de possibilidade de automação do preparo de amostras, o que permite realizar uma injeção direta de amostras ricas em macromoléculas, além de reduzir o tempo de análise e o uso de ácidos concentrados orgânicos. O princípio básico de exclusão de macromoléculas desses materiais consiste no fato de que eles possuem uma barreira hidrofílica em sua superfície, capaz de bloquear o acesso das macromoléculas aos poros que se encontram no interior. Assim, somente os analitos pequenos são passíveis de serem sorvidos.^{16,17}

Dentre os tipos de RAM já relatados na literatura, podemos destacar os polímeros - materiais tridimensionais, rígidos e sintéticos que apresentam locais de reconhecimento seletivos para o analito alvo, sendo essa seletividade obtida por meio da rede tridimensional que se forma ao redor de íons ou moléculas.¹⁸⁻²⁰ Aqueles que são seletivos por molécula são conhecidos por polímeros de impressão molecular (do inglês: *Molecular Imprinted Polymers* - MIP) e os que apresentam seletividade a íons metálicos são os chamados polímeros de impressão iônica (do inglês: *Ion Imprinted Polymers* - IIP), que apresentam as mesmas virtudes dos MIP, como simplicidade e conveniência da síntese.²¹

Os IIPs são comumente utilizados em estudo de amostras que não apresentam macromoléculas, pois são suscetíveis à ligação a esses compostos, o que inviabiliza a extração direta de amostras biológicas como o leite. Os RAMs são eficientes na exclusão de macromoléculas, porém são materiais de baixa seletividade. Uma maneira de combinar as vantagens desses dois materiais é modificar quimicamente a superfície do polímero com co-monômeros hidrofílicos afim de se obter um polímero de impressão iônica de acesso restrito (do inglês, *Restricted Access Ionic Imprinted Polymer* - RAIP). O RAIP melhora a seletividade do material, além de apresentar sítios de reconhecimento seletivos e grupos hidrofílicos externos que são responsáveis por bloquear a ligação com as macromoléculas. Porém, dados da literatura mostram que somente essa modificação, não garante uma exclusão muito efetiva e uma alternativa para melhorar a capacidade de exclusão do material, é revesti-lo com albumina sérica bovina (do inglês: *Bovine Serum Albumin* - BSA), obtendo-se um RAIP-BSA.²²

Diante do exposto, levando em consideração os riscos que o excesso de cobre pode causar à saúde dos consumidores e as limitações que as técnicas convencionais de determinação deste elemento em matrizes complexas apresentam, a hipótese desse

trabalho foi estudar a utilização de um RAIIP-BSA para determinação de cobre em amostras de leite por meio da FIA-FAAS, buscando desenvolver um método simples, preciso, exato e seletivo para esse tipo de análise.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O ELEMENTO COBRE

O cobre é um elemento químico metálico, cujo símbolo é representado por “Cu”. O nome vem de origem latina *Cuprum*, que deriva da palavra *Cyprium*, referindo-se à ilha de Chipre, local onde foi a maior fonte do metal no mundo⁸. Apresenta número atômico igual a 29, massa atômica de $63,546 \text{ g.mol}^{-1}$, tem uma boa condutividade elétrica, é dúctil, maleável, de coloração avermelhada e é sólido em condições ambientes.²³ É um dos elementos mais antigos já relatados, com objetos encontrados no Iraque datados de 8.500 *a.C.* e, provavelmente, o primeiro metal a ser descoberto e utilizado pelo homem. Sua descoberta contribuiu para o desenvolvimento das civilizações antigas, pois era um metal de fácil acesso e manuseio e, assim a humanidade evoluiu da Idade da Pedra para a Idade do Bronze em 3000 *a.C.*, onde esse elemento ganhou destaque, devido à descoberta de que com ele era possível formar as ligas metálicas.⁶

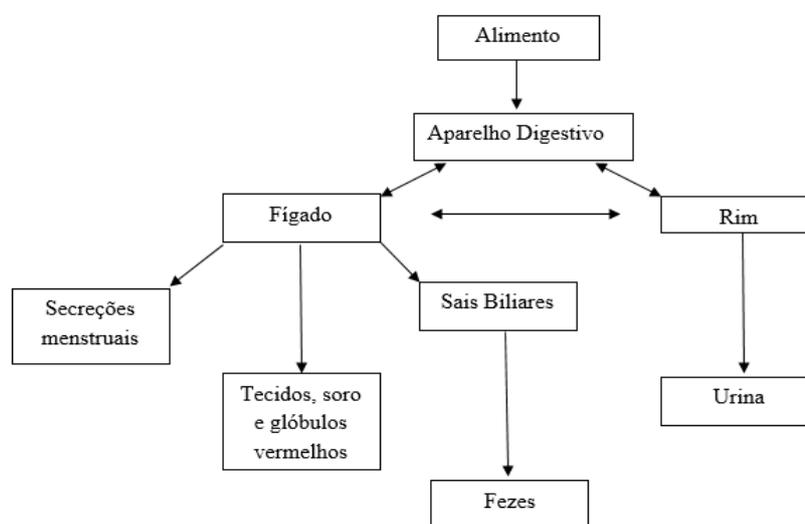
Sua expansão global se deu com a descoberta do gerador elétrico em 1831 por Faraday, que contribuiu para o desenvolvimento industrial em países como os Estados Unidos. Por ser um metal muito versátil e devido à sua facilidade de moldagem, é amplamente empregado nas indústrias metalúrgicas, como na produção de ligas metálicas, fios elétricos, tubulações e também na fabricação de moedas juntamente com o níquel (75% cobre e 25% níquel). Seus sais podem ser utilizados em fogos de artifícios e no combate à micro-organismos presentes em plantas. Devido à sua escassez no estado nativo, ele é encontrado na natureza na forma de minerais como por exemplo, malaquita, calcopirita – mais abundante- e calcocita. É o terceiro metal mais utilizado no mundo, ficando atrás do ferro e alumínio, no qual 66% do seu consumo anual é voltado para aplicações elétricas.^{6,8}

2.1.2 Cobre no corpo humano

O cobre é considerado um metal traço essencial que, no corpo humano, exerce funções específicas como a produção de colágeno, elastina, melanina, metabolismo do oxigênio, contribui com a síntese de neurotransmissores e harmoniza a quantidade de ferro no organismo, além de influenciar na absorção de vitamina C. É o terceiro elemento traço com maior abundância, sendo sua maior concentração encontrada em órgãos que

apresentam atividade metabólica por este metal, como o fígado e os rins. Tem como fonte principal de obtenção os frutos do mar, carnes vermelhas e cereais.^{6,8} De acordo com a Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, é recomendada uma ingestão diária de 0,9mg de cobre para adultos, 0,4mg para crianças de 7–10 anos e 1,0-1,3mg para gestantes e lactantes, respectivamente.²⁴ Tanto seu excesso, quanto sua falta pode ser prejudicial à saúde e causar as chamadas hiper e hipocupremia.²⁵ A figura 1 mostra o chamado “Fluxo Normal do Cobre”.²⁶

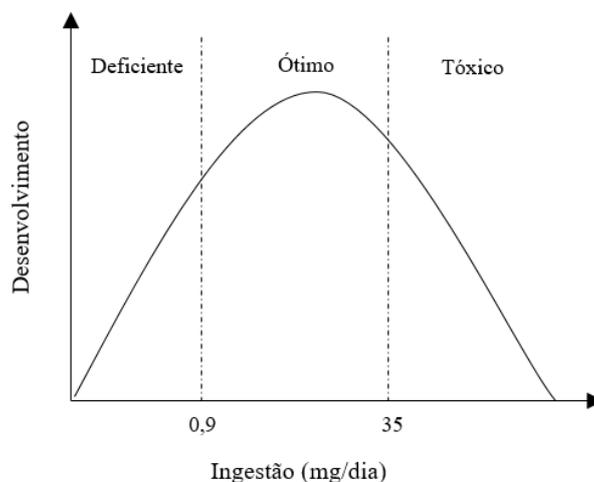
Figura 1 - Fluxo normal de cobre no corpo humano



Fonte: AZEVEDO (2002, p. 620).

O cobre proveniente do alimento é absorvido no aparelho digestivo e as paredes do estômago e intestino só retiram o que é necessário, sendo o excesso diretamente excretado. Para homens, o metal é excretado por meio das fezes, na forma de sulfetos e pela urina na forma de íons Cu^{2+} livres. Já nas mulheres, além da urina e fezes, ocorre outra forma de excreção que é através de secreções menstruais, na qual o metal é eliminado em forma de cátion livre. O que é absorvido pelo corpo, é distribuído para os tecidos, soro e glóbulos vermelhos. Alterações leves nesse fluxo não causam danos à saúde, entretanto, grandes alterações podem provocar problemas mais graves, como é possível observar na figura 2.²⁶

Figura 2 - Comportamento do cobre no organismo



Fonte: Adaptado de LIMA (2011, p. 201).

Na figura 2, observa-se que valores que compreendem uma faixa de 0,9 a 35mg/dia de cobre (IDR para um adulto) seria o ideal para o corpo humano. Entretanto, valores acima ou abaixo desses limites, apresentam um efeito de deficiência e toxicidade, respectivamente, para o corpo humano.²⁶ O excesso de cobre (hipercupremia) está relacionado com o desenvolvimento da doença de Wilson²⁷, que em casos severos pode demandar um transplante de fígado. Apresenta sintomas como a redução dos movimentos, psicose, perda da coordenação motora e alteração da fala. Entretanto, sua deficiência na alimentação (hipocupremia)²⁸ também pode gerar problemas à saúde como a osteoporose, Alzheimer, manchas na pele, entre outros. Devido a isso, o ideal é que se tenha uma dieta com concentrações balanceadas de cobre.

2.2 TÉCNICAS E MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Através da revisão da literatura, pode-se perceber que diversas são as técnicas para a determinação de metais, como o cobre, em amostras complexas. Normalmente utiliza-se aquelas que apresentam alta sensibilidade e seletividade como a ICP-MS e ICP-OES - utilizadas para determinações multielementares, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês: *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* - GFAAS) e a FAAS.¹⁰ Além dessas, há outras que não são tão comumente utilizadas, mas são relatadas na literatura como a fluorescência de raios X²⁹, polarografia de pulsos³⁰, ativação de neutrôns³¹ dentre outras. Apesar de haver outros métodos para determinar a presença de cobre nessas matrizes, a mais comumente utilizada é a FAAS.

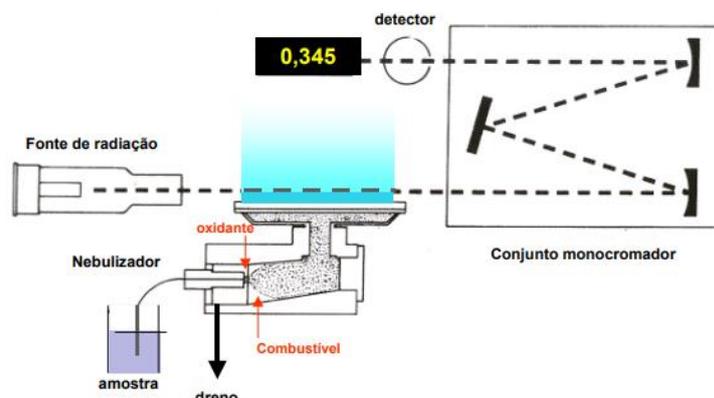
2.2.1 Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (do inglês: *Atomic Absorption Spectrometry* -AAS) é uma técnica baseada no princípio fundamental, estabelecido por Kirchoff em 1860, de que “em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles mesmos emitem”. Dessa forma, a AAS realiza a medida da absorção da radiação eletromagnética emitida por uma fonte de radiação, por átomos gasosos no estado fundamental, o que permite realizar uma análise quantitativa de metais ou semi-metais em uma infinidade de amostras. Apesar dos estudos de Kirchoff, só em 1952 foi proposto o conceito da espectrometria de absorção atômica por Alan Walsh³² considerado, portanto, o pai desta técnica.

Há dois tipos de atomizadores comumente utilizados, o forno de grafite e a chama. A GFAAS é utilizada para a determinação de traços de metais em concentrações muito baixas, $\mu\text{g.L}^{-1}$, possibilitando controlar os ambientes térmico e químico e assim, remover possíveis interferentes. As amostras são introduzidas diretamente no atomizador, ou seja, não há necessidade de um sistema de nebulização. Uma desvantagem da técnica é a baixa frequência analítica quando comparada a outras.¹³

Já na FAAS, a fonte de energia para a obtenção do átomo livre é a própria chama. A introdução da amostra é feita por meio de um nebulizador pneumático que faz com esta, em forma de aerossol, chegue até a chama para que as partículas sejam volatilizadas, atomizadas e, posteriormente, determinadas. É uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de elementos a níveis traços, mg.L^{-1} . As principais vantagens da FAAS são o baixo custo e baixo tempo de medida analítica, além de ser um método simples quando comparado a outros. As maiores desvantagens são que, devido a pequena quantidade de amostra (5-10%) que chega na chama e a necessidade de a amostra ser introduzida no equipamento em forma de solução, a sensibilidade e a detectabilidade ficam prejudicadas, além disso outra desvantagem é quanto à eficácia de nebulização.³³ A figura 3 apresenta, de forma geral, os componentes de um FAAS.³⁴

Figura 3 - Esquema do espectrômetro de absorção atômica com chama



Fonte: KRUG (2004, p.17).

2.2.2 Análise por injeção em fluxo

Com o aumento da demanda de análises químicas pelos setores farmacêuticos, industriais e agrícolas, houve o desenvolvimento de uma infinidade de instrumentos com o objetivo de realizar análises automatizadas que apresentassem vantagens como maior precisão, menor custo de ensaio individual, maior rapidez para analisar um grande número de amostras e confiabilidade. Assim surgiram os analisadores em batelada ou em fluxo.^{35,36}

Os analisadores em batelada são aqueles em que as amostras são adicionadas em recipientes individuais, nos quais pode ocorrer a adição dos reagentes, aquecimento ou adição de tampões em pontos específicos da análise, até que a amostra chegue ao detector. A amostra é estritamente preservada à medida que se move dentro do instrumento, o que garante uma contaminação mínima e permite alta taxa de amostragem.³⁷

O sistema de análise em fluxo, pode ser dividido em dois tipos: fluxo contínuo ou de parada. O de fluxo contínuo foi proposto na década de 70 por Ruzicka³⁸ e tem como princípio básico a inserção da alíquota de amostra em fluido carregador que transporta a mesma para o detector. Assim, as amostras fazem parte de uma corrente em movimento contínuo, onde reagentes são adicionados a taxas de fluxo fixas, no qual esse fluxo flui através da célula do detector para que a medição quantitativa seja executada e o sinal registrado. Utiliza-se uma bomba peristáltica para controlar a aspiração das amostras e o movimento dos líquidos nos condutos dos analisadores; já a inserção da amostra é realizada por meio de injetores proporcionais³⁹, válvula rotativa⁴⁰ ou válvulas de 6 e 8 vias.⁴¹ No sistema de parada, amostra e reagente são misturados rapidamente e forçados

para uma célula de detecção onde ocorre a interrupção abrupta do fluxo e logo após é medido o sinal analítico da solução. Uma das desvantagens do fluxo contínuo é que a nova amostra pode ser contaminada pela amostra que passou anteriormente no sistema e isso aumenta de acordo com a taxa de amostragem.³⁹

O sistema FIA apresenta diversas vantagens como i) facilidade de acoplamento com diversos detectores ii) frequência analítica alta iii) economia de reagentes e iv) minimização de contaminações. Melhorias são frequentemente realizadas para se obter um melhor desempenho como, por exemplo o fluxo intermitente.⁴²

2.2.2.1 Sistema FIA acoplado à FAAS (FIA-FAAS)

Quando uma técnica analítica, como a FAAS, não dispõe de alta sensibilidade para a determinação de analitos cuja concentração é muito pequena em relação aos concomitantes da matriz, pré-concentrar o analito torna-se necessário. Dessa forma, é comum utilizar técnicas como o FIA, a fim de realizar a pré-concentração do analito de interesse e no mínimo, ter uma análise rápida. Nesse sistema de pré-concentração, a amostra passa através de uma coluna que está preenchida com um material adsorvente e, posteriormente, o analito adsorvido pela coluna é extraído por meio de uma solução eluente adequada. Como os metais, em amostras biológicas, estão presentes em baixas concentrações, normalmente utilizam-se minicolunas que se adaptam mais facilmente aos sistemas de pré-concentração em linha, utilizando-se pequenos volumes de eluente.^{42,43}

A ideia de acoplar o sistema FIA ao FAAS, é devido, principalmente, à facilidade de acoplamento desses sistemas, com pré-concentração em linha, ao FAAS e, além disso, os efeitos de interferentes são superados. O tempo de pré-concentração depende diretamente do fator de enriquecimento, sendo que baixos fatores necessitam de menor tempo de pré-concentração e, conseqüentemente, tem-se uma alta velocidade analítica.⁴⁴

Quando se utiliza colunas em sistemas de separação contínua e com o intuito de pré-concentrar os analitos, essa separação ocorre em duas etapas: adsorção e eluição. Normalmente a amostra é líquida e pode ser introduzida no sistema por meio da aspiração ou injeção contínua, e a coluna também é parte permanente desse sistema. Nesse procedimento, ocorrem separações não cromatográficas baseadas em adsorção e troca iônica que auxiliam no aumento da sensibilidade e seletividade. Facilidade de operação, robustez e versatilidade são algumas das vantagens que esse procedimento oferece.⁴³

2.2.3 Determinação de cobre em amostras complexas

Em uma análise química, muitas vezes torna-se necessário realizar um preparo da amostra para que ela se torne compatível com a técnica analítica utilizada. No caso dos metais, pode ser feita uma digestão ácida que consiste na dissolução da matriz e na degradação da matéria orgânica. Esse processo pode ser acelerado através de micro-ondas, ultrassom ou altas temperaturas e pressão.⁴⁵

No processo envolvendo micro-ondas, uma radiação eletromagnética induz o movimento das espécies envolvidas devido a quantidade de vezes em que o campo eletromagnético alterna-se, fazendo com que haja interação entre as micro-ondas e moléculas, gerando aquecimento. É um processo que comumente utiliza-se uma mistura de ácidos e, de modo geral, a energia cinética da matriz é aumentada, causando o rompimento das camadas de superfície do sólido, permitindo um “ataque” ácido.^{46,47}

O ultrassom apresenta dois tipos de frequência mais comumente utilizados: alta e baixa. A alta frequência é utilizada em equipamentos das áreas da medicina e engenharia por apresentar baixa potência e, a de baixa frequência é utilizada em equipamentos de laboratório de química e biologia, por apresentar alta potência e ter a capacidade de alterar as características físicas e químicas do meio onde está sendo aplicada.⁴⁸

Outro tipo de preparo das amostras é feito através da pré-concentração da amostra em uma fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* - SPE), seguida da eluição utilizando solventes. Neste tipo de preparo de amostra, é utilizado cartuchos de polipropileno preenchidos com um sorvente, como as resinas de troca iônica, e é mais comumente utilizada para esse tipo de análise devido à grande variedade de sorventes e pela facilidade de combinação com diversas técnicas analíticas.

Além da SPE, outros tipos de extrações menos comuns também podem ser utilizadas, como a extração em ponto de nuvem, microextração em gota orgânica flutuante solidificada e microextração líquido-líquido dispersiva.⁴⁹⁻⁵²

Chamjangali *et al.*⁵³, determinaram cobre em amostras de água, solo e alimentos. Para pré-concentrar o analito de interesse, eles utilizaram uma mini coluna empacotada com poliestireno clorometilado modificado por 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima tiossemicarbazona na SPE *on-line*. A determinação através da espectrometria de absorção atômica com chama.

Ghaedi *et al.*⁵⁴, utilizaram a FAAS para determinar a presença de cobre em fígado bovino. Foi realizada a SPE com suporte de Duolite XAD 761, utilizando ácido nítrico

em acetona como eluente. A complexação entre os íons metálicos e o ligante proposto [bis (2 hidroxiaacetofenona) 2,2 dimetil 1,3- propanodiimina] (BHAPDMPDI) foi investigada potenciométricamente.

Em outro trabalho, Al-Saidi⁵⁵ utilizou um tipo de polímero para fazer a pré-concentração de cobre. O polímero utilizado foi o quitosana tiourea (polímero CT). A coluna extratora foi combinada com FAAS para determinar cobre em amostras de batata, chá e arroz.

Xiang *et al.*⁵⁶, utilizaram casca de soja, modificada com ácido nítrico, como adsorvente da SPE para a analisar a presença de cobre em amostras de chá, batata doce seca, água de lago e leite em pó. A determinação foi realizada por FAAS.

Suquila e Tarley¹⁰, utilizaram um polímero de impressão iônica de acesso restrito à base de poli (aliltiouréia) para determinação *on-line* de cobre e exclusão de proteínas de amostras de leite. Foi utilizado um pH 4,5 para poder pré-concentrar o analito de interesse e a eluição foi feita com ácido clorídrico. A análise foi realizada através do sistema FIA-FAAS.

2.3 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA

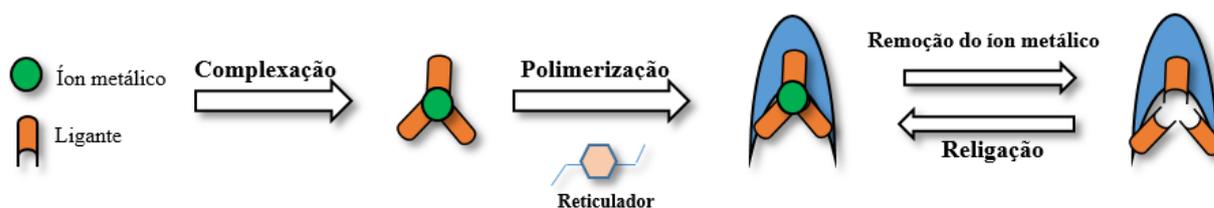
O estudo e desenvolvimento de materiais que sejam capazes de aumentar a sensibilidade e seletividade dos métodos analíticos vem aumentando ao longo dos anos, e isso pode ser alcançado através de modificações, tais como as variações nas dimensões físicas, na composição química e mudança de propriedades por meio de inserção de componentes biológicos. Uma estratégia possível é a utilização de biomateriais^{(1)56,57} com reconhecimento seletivo, no qual uma macromolécula, por exemplo, é capaz de se ligar seletivamente a uma molécula, mesmo na presença de outras estruturas, devido a presença de sítios receptores. Entretanto, esses materiais biológicos apresentam algumas desvantagens, como instabilidade, dificuldade de obtenção e elevado custo e, dessa forma, sua substituição por materiais sintéticos que apresentam o mesmo nível de seletividade, tornou-se necessária, como é o exemplo do uso dos polímeros.^{58,59}

A impressão molecular⁶⁰ é uma estratégia que se utiliza para gerar polímeros que são dotados da capacidade de reconhecimento seletivo, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula modelo, sendo conhecidos MIPs e têm sido utilizados por vários

⁽¹⁾ Materiais que contêm em sua composição compostos naturais ou artificiais integrados ao sistema biológico com o intuito de tratar, substituir e complementar tecido ou órgão com função danificada.

anos em separações quirais⁶¹, SPE⁶², aplicações cromatográficas⁶³ e outros. Uma variante dos MIPs são os IIPs, que foram introduzidos em 1976 por Nishide *et al.*⁶⁴ e apresentam a mesma eficácia que os MIPs, porém altera-se a molécula modelo por um íon metálico. Além disso, as moléculas interagem com o MIP através de forças de Van der Waals ou através das ligações de hidrogênio, enquanto nos IIPs, para obter os sítios de reconhecimento, há a necessidade de um ligante para formar um complexo com o íon metálico. Dessa forma, as interações são realizadas por meio de ligações coordenadas entre doadores de elétrons, como o nitrogênio, e orbitais vazios do íon metálico.⁶⁵ O procedimento geral para sintetizar um IIP ocorre em três etapas²¹, como é possível observar na figura 4.⁶⁵

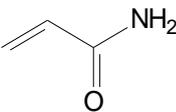
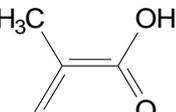
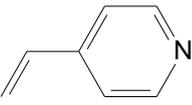
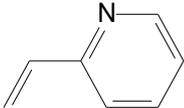
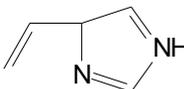
Figura 4 - Representação da síntese de um IIP



Fonte: Adaptado de BRANGER (2013, p.2).

Na primeira etapa, ocorre a formação do íon complexo entre o íon metálico e o monômero funcional (MF) – ligante- em um meio reacional contendo solvente. O íon metálico deve conter algumas particularidades: ser adequado à ligação, não apresentar grupos envolvidos na polimerização e ser capaz de conservar a estabilidade química. O solvente, não deve interferir na formação do complexo, deve permitir a solubilização dos reagentes e é responsável pelas características morfológicas e porosidade do material. Os monômeros são escolhidos de acordo com o analito a ser utilizado e determinam a seletividade do material e a quantidade de sítios ativos disponíveis.⁶⁵⁻⁶⁹ Diversos são os tipos de monômero funcionais, entretanto, os mais comumente utilizados são apresentados na tabela 1.⁷⁰

Tabela 1 - Monômeros funcionais mais utilizados

Monômero funcional	Nome do monômero
	Acrilamida
	Ácido metacrílico
	4-Vinilpiridina
	2-Vinilpiridina
	4-Vinilimidazol

Fonte: SANTOS (2015, p.23).

A segunda etapa, após complexação efetiva, trata-se da polimerização do complexo. Nessa etapa, adicionam-se o agente de ligação cruzada (ALC) e, posteriormente, o iniciador radicalar (IR). A escolha do ALC deve ser feita de modo que haja diminuição de cavidades não seletivas e o aumento das cavidades efetivas. Ele é responsável por proporcionar a ligação entre as cadeias poliméricas que são formadas pelo MF, gerando então uma rede rígida na qual o modelo e as cavidades são fixadas. Os agentes que apresentam alto peso molecular ou maior ramificação, são responsáveis por proporcionar maior estabilidade a essas cavidades e, dessa forma, deixam o polímero mais adequado. O mais amplamente utilizado é o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA).⁶⁹

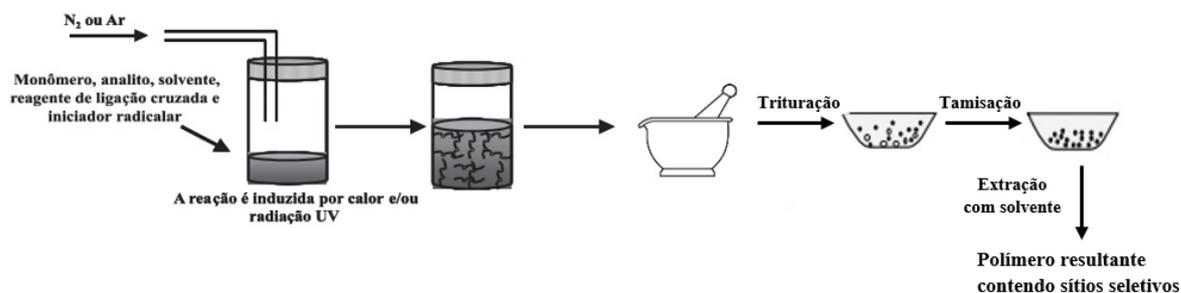
O IR gera radicais que são responsáveis pela reação de polimerização, devido à quebra em sua estrutura e é responsável por estabilizar os “sítios ativos” garantindo que haja sítios íntegros para ligações com os íons de interesse, caso houver necessidade de reutilização.^{66,71} A remoção do íon metálico, após a polimerização, ocorre na terceira etapa. Essa remoção deixa locais de ligação ativos que apresentam características semelhantes ao analito de interesse, o que garante a alta seletividade do polímero.⁶⁶

Para avaliar a seletividade e a eficiência de um IIP, é comum realizar o teste de seletividade do polímero e a religação ao íon metálico. Esse teste é feito por meio da avaliação de alguns fatores como i) tamanho e carga do íon ii) número de coordenação dos íons; iii) geometria de coordenação do complexo; e iv) especificidade do monômero

em relação ao íon. Na literatura, a síntese de um IIP pode ser feita de quatro maneiras, sendo sua escolha influenciada pelas características do polímero e sua função na aplicação. Os métodos de polimerização podem ser: i) *in bulk*; ii) polimerização em suspensão; iii) polimerização por precipitação e iv) polimerização por emulsão ou superfície. Além disso, é possível classificá-los em dois grupos: o 2D e 3D.⁷² O 2D deixa os sítios ativos mais expostos aos analitos e diante disso, é mais indicado para a polimerização de superfície.⁷³ Já o 3D, inibe a exposição dos sítios ativos devido às suas cavidades serem distribuídas por toda a superfície do polímero – nas três dimensões – e é indicado para a método *in bulk* e suspensão.⁷⁴

O método *in bulk* é o mais utilizado para esse tipo de síntese. Ele é realizado em um sistema homogêneo no qual o MF, molde, ALC e IR são solubilizados no solvente porogênico e adicionados à uma ampola de síntese que é selada após a remoção do oxigênio, sendo essa realizada por meio do borbulhamento com argônio ou nitrogênio. A síntese ocorre por meio de aquecimento e/ou radiação UV e, após seu término, obtêm-se monólitos (sólidos) que são triturados, para permitir acesso ao analito, peneirados em grau com intuito de padronizar o tamanho das partículas. O processo final é a lavagem do material utilizando solventes ou soluções para a remoção do molde.^{18,65} Apesar da facilidade, esse método apresenta algumas limitações como o tamanho da partícula não uniforme e relativamente grande, pode apresentar instabilidade térmica e destruição de sítios ativos na fase de trituração. Por isso, em algumas aplicações utilizando o HPLC, por exemplo, outros tipos de polimerização são mais indicados.⁶⁶⁻⁶⁸ A figura 5 mostra o esquema desse tipo de polimerização.⁶⁹

Figura 5 - Esquema da polimerização *in bulk*



Fonte: Adaptado de TARLEY (2005, p.1078).

A polimerização por suspensão é considerada um processo heterogêneo no qual o IR é solúvel no MF e ambos são insolúveis na fase contínua do processo – normalmente a água.⁷⁵ A reação ocorre dentro de micelas do MF, sendo essas estabilizadas por meio

de surfactantes que evitam a coagulação das gotas do MF.²¹ A reação ocorre por meio de aquecimento ou incidência de radiação com agitação constante onde MF, analito, ALC e IR são solubilizados no solvente orgânico e, em seguida, adicionados em água.¹⁸ A agitação auxilia no aumento do polímero que pode obter o tamanho esférico de 5 a 50 µm. É um método rápido, síntese em torno de 2 horas, e as partículas obtidas são de tamanho e forma bem definidos, apresentando sítios de ligação mais uniformes.⁷⁶

O método por precipitação é análogo ao *in bulk*, entretanto, utiliza-se volumes maiores de solvente – cerca de cinco vezes mais – com o intuito de não formar os monólitos. A síntese é realizada em agitação constante para que haja formação de partículas mais homogêneas e formas e tamanho mais regulares. Assim como os outros métodos, a reação pode ocorrer por meio de calor ou radiação UV, entretanto, é necessário que haja um sistema de alívio de pressão para evitar possíveis explosões.^{18,21}

Por fim, a polimerização de superfície é uma das mais utilizadas quando a produção de filmes poliméricos é requerida. Apresenta estabilidade devido ao alto peso molecular dos polímeros que são formados e, em condições ácidas, também apresenta estabilidade, tornando-a favorável para a remoção de metais, visto que estes são solúveis nessas condições. Uma das principais vantagens é quanto à cinética de adsorção e dessorção que é bem rápida e ao tamanho da partícula, evitando-se aglomeração, contudo, apresenta baixo rendimento.⁷⁶⁻⁷⁸

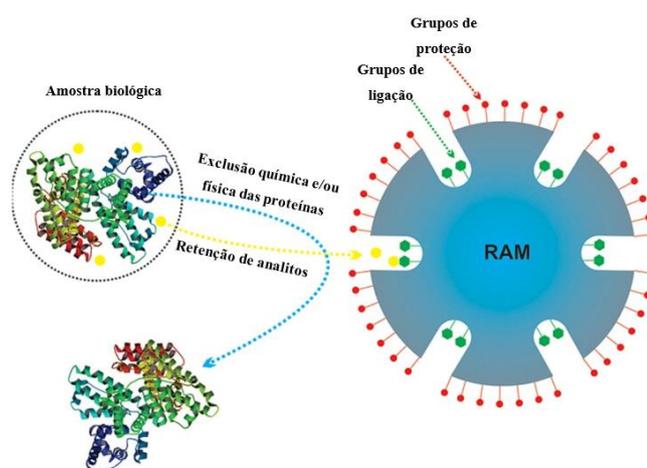
2.4 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

A análise de compostos inorgânicos em amostras biológicas demanda cuidado para que se obtenha resultados confiáveis, pois uma das maiores causas de erros e problemas nesta etapa analítica é a presença de macromoléculas (proteínas, por exemplo), que podem causar problemas nas análises e até mesmo nos equipamentos. Pensando nisso, novas estratégias começaram a ser desenvolvidas para excluir as macromoléculas em procedimentos de extração e um exemplo é a utilização dos materiais de acesso restrito (RAMs)¹⁷

O surgimento do RAM ocorreu em 1985 com Hagestam e Pinkerton, mas foi apenas em 1991, por Desilets *et al.*, que a expressão realmente foi utilizada.⁷⁹ O impedimento da sorção de macromoléculas ocorre por meio de um processo de exclusão por tamanho. A exclusão é realizada devido à presença de poros que apresentam grupos ligantes em seu interior que permitem que somente analitos pequenos penetrem na parte

hidrofóbica, também chamada de barreira física, onde ficam seletivamente retidos por meio de partição, adsorção e/ou troca iônica. Já na superfície do RAM, pode apresentar uma parte hidrofílica – barreira química – que evita a adsorção da matriz proteica. De modo geral, durante uma extração, as partículas pequenas ficam retidas nos poros por meio dos grupos ligantes e as macromoléculas passam pelo RAM e são descartadas.^{80,81} O esquema de exclusão pode ser observado na figura 6.

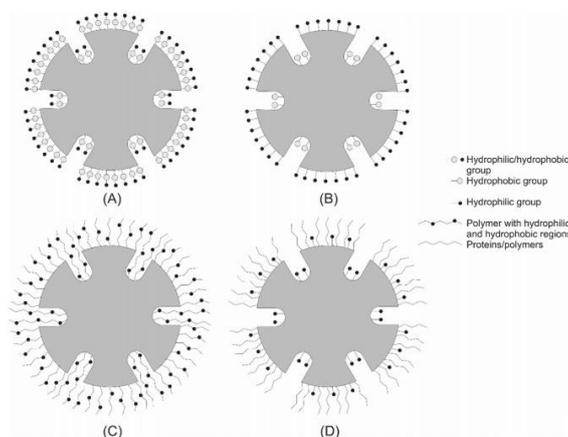
Figura 6 - Mecanismo de exclusão de macromoléculas pelo RAM



Fonte: Adaptado de De Faria (2017)

Os RAMs são classificados de acordo com suas superfícies químicas. Se as propriedades de ligação nas superfícies interna e externa forem as mesmas, então é chamada de fase unimodal, entretanto, se as propriedades são diferentes, é chamada de fase bimodal. Ademais, com base na presença de grupos hidrofílicos ou de poros, a exclusão feita pelos RAMs pode ser realizada por meio de barreiras químicas de difusão ou físicas. Com isso, os RAMs são divididos em quatro grupos, como descrito na figura 7.^{16,79}

Figura 7 - Classificação dos sorventes em relação ao seu tipo de barreira e os poros



Fonte: De Faria (2017, p. 45).

Legenda: (A) e (B) barreiras de difusão física com fases unimodais e bimodais, respectivamente; (C) e (D) barreiras de difusão química com fases unimodais e bimodais, respectivamente.

Polímeros, nanotubos de carbono e materiais à base de sílica são materiais que podem ser convertidos em RAMs através da modificação de suas superfícies utilizando co-mônômeros hidrofílicos. Os co-mônômeros geram grupamentos hidroxilas responsáveis pela criação da barreira química, impedindo assim a sorção de macromoléculas. Um co-mônômero que é bastante empregado é o glicerol metacrilato (GMA).

Uma alternativa para melhorar a exclusão de macromoléculas, é realizar o revestimento do material utilizando a albumina sérica bovina (BSA). Normalmente, o processo de recobrimento é realizado por meio da utilização de glutaraldeído, que une as moléculas de BSA através de reações de entrecruzamento, formando uma rede que impede que as macromoléculas acessem os sítios de ligação como analitos.^{82,83} Após o recobrimento com BSA há uma melhora na exclusão de proteínas da amostra devido ao impedimento estérico que esta barreira provoca, permitindo a passagem de apenas pequenas moléculas/íons. Além disso, o ideal é que a camada de BSA e a proteína da amostra apresentem o mesmo ponto isoelétrico, pois, quando variar o pH, o somatório das cargas superficiais será próximo e assim, ao utilizar um pH acima do ponto isoelétrico, ambos terão a mesma carga, provocando a repulsão eletrostática e impedindo a adsorção das proteínas no material.⁸⁴

2.5 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO

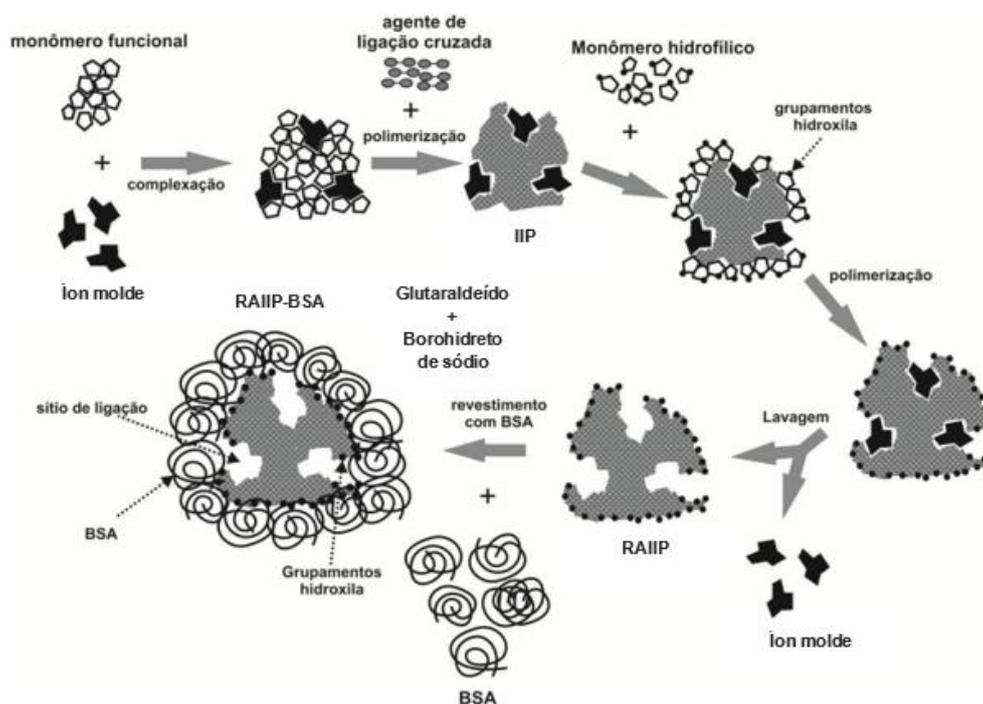
Como dito anteriormente, os IIPs são materiais que se destacam por apresentar estabilidade frente às variações de pH, adsorção elevada e alta seletividade ao íon de interesse. Contudo, são capazes de reter macromoléculas em sua superfície, inviabilizando a injeção direta de matrizes complexas que apresentam uma grande quantidade de proteínas em sua composição. Uma vez que as macromoléculas ficam retidas, a seletividade do material diminui drasticamente e dessa forma, perde-se a sua principal característica.²¹ Por outro lado, os RAMs são capazes de excluir as macromoléculas por meio de barreiras de difusão química, física ou físico-químicas, entretanto, apresentam baixa seletividade devido à capacidade de reter qualquer tipo de íon pequeno.⁸⁵

Diante disso, foi proposta a junção desses dois materiais, a fim de unir a vantagem de ambos e dessa forma, obter um polímero que possa ser utilizado na análise de amostras complexas, sendo capaz de excluir macromoléculas, sem que ocorra a perda da sua seletividade; é conhecido por polímero de impressão iônica de acesso restrito (do inglês: *Restricted Access Ionic Imprinted Polymer* - RAIP). Na literatura, poucos são os trabalhos que citam a utilização de RAIP⁸⁶⁻⁸⁸, sendo essa uma estratégia nova.

O princípio utilizado para se obter um RAIP é análogo ao de um polímero de impressão molecular de acesso restrito (do inglês: *Restricted Access Molecular Imprinted Polymer* – RAMIP). Os RAIPs podem ser obtidos por meio de monômeros hidrofílicos ou por monômeros que, após tratamento específico, se tornam hidrofílicos. No primeiro tipo, a síntese ocorre de modo tradicional e então é feito um revestimento responsável pela barreira hidrofílica.⁸⁹ Já no segundo tipo, os monômeros utilizados só se tornam hidrofílicos após devido tratamento como, por exemplo, o uso do glicidil metacrilato (GMA) que sofre abertura dos seus anéis epóxidos com o auxílio do ácido perclórico, formando-se então uma barreira hidrofílica.⁹⁰

De acordo com o trabalho desenvolvido por Puoci *et al.*⁹⁰, apesar da presença da camada hidrofílica, a exclusão de proteínas fica em torno dos 85%. Em um trabalho desenvolvido por Santos e colaboradores⁹¹, verificou-se que a estratégia de associação de duas camadas protetoras era capaz de excluir praticamente 100% das proteínas presentes na amostra. Pensando nisso, a estratégia desse trabalho foi associar ao polímero de superfície modificada, o revestimento com a albumina sérica bovina (RAIP-BSA). A figura 8 apresenta o esquema para obtenção do RAIP-BSA⁹²

Figura 8 - Esquema de síntese do RAIP-BSA



Fonte: Adaptado de SILVA (2014, p.33)

2.6 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS

Com os avanços tecnológicos, como o uso de espectrômetros e cromatógrafos em análises de rotina, houve um aumento e variedade nos dados obtidos; além disso, muitas vezes eles precisam ser transformados e interpretados adequadamente para que sejam proveitosos ao conhecimento químico. Pensando nisso, houve o desenvolvimento da quimiometria – ferramenta estatística e matemática que tem como objetivo disponibilizar ferramentas que sejam capazes de converter uma infinidade de dados químicos em informação útil, por meio de um pequeno número de experimentos estatisticamente significativos.⁹³⁻⁹⁵

Em um método analítico, muitas vezes é necessário que haja a otimização das variáveis para se estabelecer as melhores condições de análise, sendo essa uma das etapas mais críticas de um trabalho. A otimização pode ser tanto univariada (OU) quanto multivariada (OM). A OU é utilizada quando se pretende analisar uma única característica (variável) por vez. Já a OM corresponde às análises simultâneas de um conjunto de variáveis, sejam elas similares ou não. Com isso, a principal diferença entre os dois tipos

de otimização são os conjuntos de variáveis a serem analisados.^{96,97} Devido a algumas desvantagens da OU, como o alto custo para realizar os estudos independentes e a não consideração de interações de maior ordem, que podem resultar em dados errôneos, os planejamentos multivariados têm sido cada vez mais utilizados, pois com eles é possível reduzir os custos, tempo experimental e interações de maior ordem são consideradas.⁹⁸ Normalmente na OM, utilizam-se planejamentos fatoriais com a finalidade de selecionar variáveis significativas.^{98,99}

2.6.1 Planejamento fatorial completo

Em investigações preliminares, normalmente utiliza-se um planejamento de primeira ordem que é aquele que estuda cada fator em apenas dois níveis – planejamento fatorial completo de 2 níveis – sendo possível observar se determinadas variáveis/fatores influenciam no resultado.¹⁰⁰ Os experimentos são realizados em todas as combinações dos níveis das variáveis e a lista dessas combinações é chamada de matriz de planejamento. A quantidade de fatores é representada por K e o número de níveis é sua própria quantidade (2 níveis, por exemplo) e com isso, o planejamento pode ser representado por 2^k experimentos. Por exemplo, para uma quantidade de 5 fatores tem-se $2^5 = 32$ experimentos, para 4 fatores: $2^4 = 16$ experimentos. Além disso, normalmente utiliza-se os sinais (+) e (-) para identificar os níveis estudados.¹⁰¹

A influência das variáveis e o efeito de resposta são analisados a fim de compreender os processos estudados. Os efeitos estão relacionados com a alteração dos níveis – do menor (-) para o maior (+) e podem ser de dois tipos: efeitos de interação e principal. Os efeitos de interação ocorrem devido às interações das variáveis, podendo ser classificado em segunda, terceira ou ordem superior e seu sinal é definido como o produto das variáveis envolvidas. Já o efeito principal é devido a mudança de níveis de alguma variável.¹⁰¹ Na tabela 2 é possível observar a quantidade experimentos que devem ser realizados para 2 fatores.

Tabela 2 - Planejamento fatorial para 2 fatores

2 FATORES (VARIÁVEIS)		
Experimentos	Variáveis	
	K ₁	K ₂
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	-1
4	-1	+1

Fonte: Adaptado de NUNES (2011, p.17)

Como exemplo da utilização do planejamento multivariado em amostras de Cu^{2+} utilizando IIP, Suquila e Tarley¹⁰ (2019) realizaram um planejamento fatorial 2^3 , com três variáveis: massa do polímero (mg), taxa de fluxo de pré-concentração ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e concentração do eluente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Absorbância e eficiência da sensibilidade foram utilizadas para verificar a significância dos fatores e a sua interação. O estudo mostrou que a relação massa do polímero X concentração do eluente e o fator de vazão de pré concentração foram estatisticamente significantes quando levado em consideração a absorbância. Para a eficiência da sensibilidade, o fator de vazão de pré concentração foi o mais importante.

De Oliveira *et al.* (2020)⁸⁸ também realizaram a otimização multivariada utilizando IIP, porém, para análise de Cd^{2+} e utilizaram o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} . Nesse tipo de planejamento, os efeitos principal e de dois fatores são confundidos com efeitos de quatro e três fatores, respectivamente. Os fatores foram: tipo de eluente e a sua concentração, massa do polímero, taxa de fluxo de pré-concentração e concentração do tampão; dois níveis foram estudados. O estudo mostrou que a taxa de fluxo de pré-concentração foi o fator mais significativo seguido pela massa e eluente. Concentração do tampão e do eluente, bem como os efeitos da interação, não foram estatisticamente significantes.

2.6.2 Matriz de Doehlert

Um outro tipo de planejamento multivariado é a Matriz de Doehlert que permite analisar duas, três ou mais variáveis e obter, respectivamente, um domínio circular, esférico e hiperesférico. Surgiu no ano de 1970 após ser desenvolvida por David Doehlert,

permitindo então o estudo simultâneo de grande quantidade de variáveis. É um planejamento de segunda ordem que permite a construção de planejamentos sequenciais e a estimativa de parâmetros em modelos quadráticos, além de apresentar um amplo domínio experimental. O número de ensaios, N, é o que determina a extensão do domínio, dessa forma, K variáveis ($2 \leq K \leq 10$) precisam de $K^2 + K + 1$ experimentos e mínimo de três níveis para cada. Se forem empregados dois fatores, o número de níveis é 3 e 5, sendo possível analisar maior número de níveis para as variáveis importantes. Outra característica relevante é que a matriz precisa de um número menor de experimentos se comparada a outros planejamentos.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Os valores codificados (X_i) e o número de variáveis da matriz experimental definem o planejamento. A equação (1) representa essa relação:¹⁰⁶

$$x_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \beta_d \quad (1)$$

Sendo x_i o valor codificado para o nível do fator i ; Z_i é o valor experimental; Z_i^0 é o valor experimental no ponto central; ΔZ_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior e β_d é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator.

O planejamento Doehlert é ideal para obter modelo de regressão e, após obtenção da equação e do modelo, as análises estatísticas são realizadas por meio de softwares responsáveis pelo tratamento de dados. Normalmente utiliza-se o programa *Octave* e para avaliar o modelo, usa-se o modo ANOVA (*Analysis of Variance*).

Devido as vantagens do planejamento Doehlert e por acreditar que é uma ferramenta eficiente, ele foi utilizado na otimização do método de análise de cobre em amostras de leite, por meio do RAIP-BSA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um método de extração *on-line* em fase sólida empregando um polímero de impressão iônica de acesso restrito recoberto com BSA (RAIIP-BSA) como sorvente para a extração e pré-concentração de cobre em amostras de leite, seguida da análise em fluxo acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama (FIA-FAAS).

3.2 Específicos

- a) Sintetizar o polímero de impressão iônica e revesti-lo com albumina sérica bovina para obtenção dos polímeros de impressão iônica de acesso restrito (RAIIP-BSA);
- b) Caracterizar o material por meio da termogravimetria e espectroscopia no infravermelho;
- c) Estudar o perfil de adsorção de cobre pelo RAIIP-BSA;
- d) Otimizar as condições de análise e extração de amostras;
- e) Validar do método desenvolvido;
- f) Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de leite adquiridos no comércio de Alfenas e região.

4 METODOLOGIA

4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os equipamentos e acessórios utilizados são listados a seguir:

- a) Vidrarias apropriadas;
- b) Tamises de várias malhas;
- c) Pipetas apropriadas;
- d) pHmetro (Quimis, Brasil);
- e) Balança analítica (Shimadzu, Japão);
- f) Chapa aquecedora com sistema de agitação (Novatecnica, Brasil);
- g) Agitador de tubos (IKA, Brasil);
- h) Centrífuga (Novatecnica, Brasil);
- i) Espectrômetro infravermelho FT-IR (Shimadzu, Japão);
- j) Bomba peristáltica (Ismatec, Alemanha);
- k) Tubos Tygon® (Courbevoie, França);
- l) Espectrômetro de absorção atômica (Kyoto, Japão);
- m) Manifold à vácuo (Sigma-Aldrich, EUA);
- n) Termobalança TG/DTA -7300 (SII Nano Technology, Japão).

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

A 4 vinilpiridina (pureza 95%), etilenoglicol dimetacrilato, glicidil metacrilato, cobre (II), 4,4-azobis (ácido 4-cianoaléxico), albumina sérica bovina, borohidreto de sódio, ferro (II) nitrato de sódio e zinco (II) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha). Acetonitrila (grau para HPLC) e glutaraldeído foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha). O ácido perclórico e ácido nítrico foram obtidos da Anidrol® (Diadema, Brasil). Fosfatos de potássio monobásicos e dibásicos, hidróxido de sódio, cloreto de potássio e cloreto de magnésio foram adquiridos da Synth® (Diadema, Brasil). Cloreto de sódio adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Água ultrapura (18,2 MΩcm) foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Ácido clorídrico foi adquirido da ACS Científica (Sumaré, Brasil). O leite foi adquirido em mercado local.

4.3 SÍNTESE E REVESTIMENTO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP-BSA)

O RAIP foi obtido pelo método *in bulk*^{18,40}. 4-Vinilpiridina, padrão de Cu^{2+} , etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 4,4 - Azorbis (4- ácido cianoaléico) (A4-CA) foram usados, respectivamente, como monômero funcional (MF), *template*, agente de ligação cruzada (ALC) e iniciador radicalar (IR). Acetonitrila grau HPLC foi usada como solvente porogênico e o glicidil metacrilato (GMA) como co-monômero hidrofílico.

Inicialmente, adicionou-se em uma ampola de síntese, o *template* (1,6 mmol), MF (6,5 mmol) o solvente porogênico (10mL), levou ao ultrassom por 5 min e borbulhou-se N_2 durante 10 min; decorrido esse tempo, adicionou-se o ALC (6 mL), IR (50 mg), o GMA (8,0 mmol) e repetiu-se o processo do ultrassom e borbulhamento. Após a remoção do O_2 , por meio do borbulhamento, o recipiente foi lacrado e levado ao banho de óleo a 80°C por 24h. A síntese do polímero não impresso, foi realizada de maneira análoga, mas sem a presença do Cu^{2+} (*template*), para estudar a seletividade do material. Decorrido o tempo de síntese, houve a formação de monólitos que foram triturados e peneirados em grau, selecionando-se partículas de 75 a 106 μm . O material foi lavado com água destilada até remoção completa do Cu^{2+} e deixado na estufa por 12h.

Para abertura do anel epóxido do GMA, utilizou-se 400 mg de IIP e adicionou-se 25 mL de uma solução de ácido perclórico 10% v/v; as soluções foram colocadas em tubos de vidros e deixadas em agitação – 200 rpm – por 24h. Após esse período, o material foi lavado até pH neutro e levado à estufa – 70°C - por 12h. Com a abertura do anel, obteve-se o RAIP e RANIP.

Para se obter uma exclusão de macromoléculas mais eficiente, os polímeros foram recobertos com BSA de acordo com a metodologia proposta por Moraes *et al.*¹⁰⁷ Foram usados 500 mg de RAIP e RANIP e ambos foram colocados, separadamente, em cartuchos de polipropileno, acoplados ao manifold à vácuo e então foram percolados 20 mL de BSA 1% (m/v) em tampão fosfato (0,05 mol.L⁻¹; pH 6,0) a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Posteriormente, percolou-se 5 mL de uma solução de glutaraldeído 25% (v/v) também a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e foi deixado em contato com o material durante 5h. Após esse tempo, percolou-se 10 mL de uma solução de borohidreto de sódio 1% (m/v) e por fim, os polímeros foram lavados com água e deixados na estufa – 70°C – por 12h. Obtendo-se, portanto, o RAIP-BSA E RANIP-BSA.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP)

A caracterização dos polímeros obtidos foi realizada a fim de se avaliar a efetividade das etapas de síntese e revestimento, bem como obter informações acerca da estabilidade térmica.

4.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FT-IR) é utilizada com o intuito de se obter informações relativas à composição do polímero além de determinar a reatividade de cada tipo de grupo polimerizável dos monômeros, incorporação de grupos funcionais e quantificação do grau de polimerização.¹⁰⁸

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Nicolet iS50 com transformada de Fourier - FT-IR usando o acessório ATR com a janela Germânio. Os espectros foram obtidos empregando 32 varreduras por espectro com resolução de 4cm^{-1} . A região de varredura está compreendida entre $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$. O equipamento encontra-se localizado no Laboratório de análise e caracterização de fármacos (LACFar), UNIFAL-MG, Alfenas.

4.4.2 Análise térmica

Por meio de uma análise térmica é possível medir as propriedades físicas de uma substância e/ou os produtos de reação em função da temperatura com programação controlada. Um tipo de análise térmica é a termogravimétrica (TG) que é utilizada para quantificar análises de reações térmicas que podem ser acompanhadas de mudanças de massas como: desidratação, absorção de gás, evaporação e decomposição.¹⁰⁹

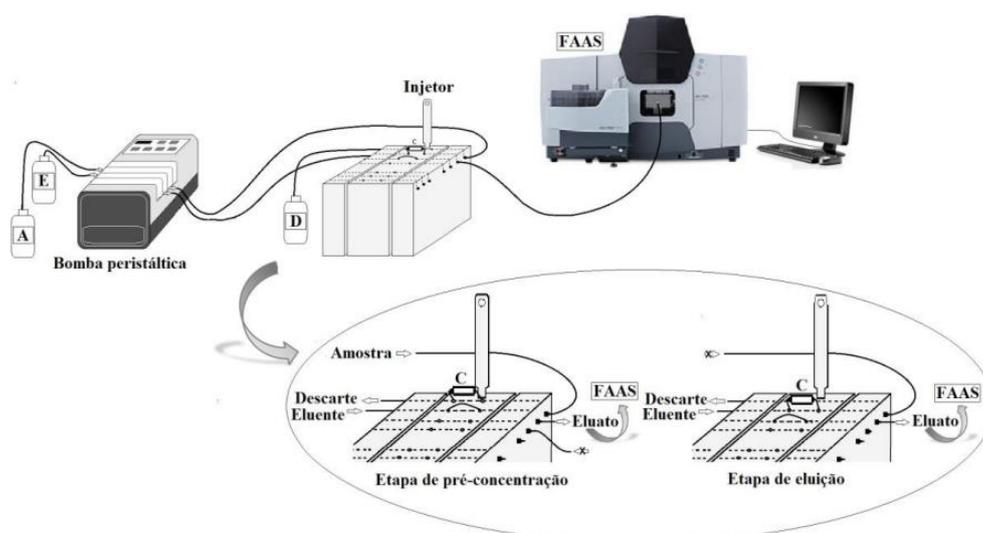
As curvas simultâneas TG-DTG foram obtidas usando o sistema Termobalança TG/DTA -7300 (SII Nano Technology, Japão) da Exstar®, alocado no Laboratório de análise e caracterização de fármacos (LACFar), UNIFAL-MG, Alfenas. As condições de análise foram: atmosfera de nitrogênio, $T_{\text{inicial}} = 25^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{final}} = 800^{\circ}\text{C}$, vazão do nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento: 10°C .

4.5 SISTEMA FIA-FAAS PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DE COBRE EM LEITE

Um diagrama esquemático do sistema para pré-concentração e extração do Cu^{2+} usando o sistema FIA-FAAS é mostrado na figura 9¹¹⁰. No sistema tem-se uma bomba peristáltica que é responsável pelo fluxo da amostra e eluente, um injetor proporcional onde fica a coluna para pré-concentração e extração do analito e o detector, FAAS, que fica acoplado ao injetor proporcional. O adsorvente RAIIP-BSA foi acondicionado em uma minicoluna cilíndrica caseira feita de seringa descartável (5,0 cm de comprimento e 3,8 mm de diâmetro interno) e suas extremidades foram vedadas por um pequeno pedaço de tecido de algodão como material filtrante para evitar perdas do polímero durante os ciclos de pré-concentração/eluição. A massa utilizada de material foi de 330 mg.

As análises foram realizadas percolando alíquotas de 20 mL de leite UHT semidesnatado em pH 7,0 com o injetor na posição de pré-concentração, a uma vazão de $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Após passagem de toda amostra, comutou-se o injetor proporcional para a posição de eluição, fazendo com que o eluente, $\text{HCl } 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, entrasse em fluxo, passando pela coluna, retirando o analito de interesse e levando para o detector FAAS a uma vazão de $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A altura de pico (absorbância) foi avaliada como resposta analítica. Experimentos com soluções em branco foram executados nas mesmas condições.

Figura 9 - Representação esquemática do sistema FIA-FAAS



Fonte: LIMA (2012, p.115).

Legenda: E: eluente; A: amostra; D: descarte; C: coluna; FAAS: espectrômetro de absorção atômica com chama.

As análises foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica com chama modelo AA-7000, Shimadzu® (Kyoto, Japão), equipado com lâmpada de cátodo oco (8,0 mA) de Cu^{2+} com comprimento de onda equivalente a 324,8 nm e uma lâmpada de deutério para correção de fundo. A chama foi obtida com vazão de 1,8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de acetileno e 15,0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar. O equipamento encontra-se localizado no laboratório de pesquisa de química analítica instrumental (GPQAI), UNIFAL-MG.

4.6 CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

O processo no qual moléculas/íons de uma substância se acumulam em uma interface é conhecido por adsorção. Os dados obtidos para cinética de adsorção vão indicar o tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre o sorvente e analito, enquanto as isotermas são usadas para avaliar a adsorção do material em um tempo e temperatura constantes.^{111,112}

Para realização da cinética, foi preparada uma solução de Cu^{2+} em pH 7,0 e concentração equivalente a 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os tempos selecionados para o experimento foram de 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos, utilizando 10 mg de RAIP-BSA. Os experimentos foram feitos em triplicata, mais o branco. Para o procedimento, foram pipetados 1,5 mL da solução de Cu^{2+} sobre o material e colocado sob agitação, a 1000 rpm, nos períodos estipulados. Dado o tempo, as soluções foram centrifugadas para deposição do material e, posteriormente, o sobrenadante recolhido foi filtrado. As leituras foram feitas no FAAS para a determinação da concentração de Cu^{2+} na solução remanescente. A massa adsorvida pelo material foi calculada levando em consideração a diferença da massa de analito total antes da adsorção, a massa remanescente na solução e a massa total de RAIP-BSA usada. Todos os resultados foram tratados segundo os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção (Elovich) e ordem fracionária, plotados no modo não-linear, usando o software OriginPro 8.5 (OriginLab®, Reino Unido).

A isoterma de adsorção foi construída utilizando solução de Cu^{2+} em pH 7,0 e 10 mg de RAIP-BSA. As concentrações avaliadas foram: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo todas as concentrações estudadas em triplicata. Foram pipetados 1,5 mL das soluções de Cu^{2+} , nas concentrações supracitadas, em tubos de ensaio contendo o material e deixados sob agitação a 1000 rpm, durante 10 minutos. Dado o tempo, as soluções foram centrifugadas para deposição do material e, posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e filtrado. A massa adsorvida pelo material foi calculada

levando-se em consideração a diferença da massa de analito total antes da adsorção, a massa remanescente na solução e a massa total de RAIP-BSA usada. Todos os resultados foram tratados segundo os modelos de isoterma Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich Peterson, plotados no modo não-linear, usando o Software OriginPro 8.5 (OriginLab®, Reino Unido).

4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Em um sistema de pré-concentração, os parâmetros que mais exercem influência sobre o sistema são: volume da amostra, tipo de eluente, concentração do eluente, pH da amostra e vazão de pré-concentração, sendo esses determinados de acordo com o sistema a ser utilizado. Além disso, a otimização desses fatores é fundamental para se obter um procedimento analítico reprodutível e eficiente, sendo essa uma das etapas mais críticas do trabalho.¹¹³

Inicialmente, foram avaliados de forma univariada a diluição e volume da amostra e o tipo de eluente. Para a diluição, foram testadas as proporções de leite: água 1:50; 1:10; 1:5; 1:1 e sem diluir. Quanto ao volume de amostra, estudou-se 10, 20, 30, 40 e 50 mL, utilizando a condição de diluição já otimizada e por fim, analisou-se dois eluentes: HCl e HNO₃. Para a otimização do eluente, utilizou-se as condições de volume da amostra e diluição anteriormente otimizadas.

Posteriormente, as variáveis mais influentes, tais como pH da amostra, vazão de pré-concentração e concentração do eluente, foram avaliadas para realizar a otimização do método. O pH da amostra foi ajustado com solução de NaOH ou HNO₃ ambas na concentração de 0,1 mol.L⁻¹. Assim, foi realizado um planejamento fatorial completo de ordem 2³. O planejamento experimental foi feito em triplicata no ponto central, a fim de estimar o erro experimental e os valores foram avaliados em dois níveis. A tabela 3 mostra os valores reais e codificados.

Tabela 3 - Valores do planejamento fatorial para três variáveis

Experimentos	pH	VP (mL.min ⁻¹)	C.E (mol.L ⁻¹)
1	4,0 (-1)	3,0 (-1)	0,1 (-1)
2	10,0 (1)	3,0 (-1)	0,1 (-1)
3	4,0 (-1)	7,5 (1)	0,1 (-1)
4	10,0 (1)	7,5 (1)	0,1 (-1)
5	4,0 (-1)	3,0 (-1)	1,0 (1)
6	10,0 (1)	3,0 (-1)	1,0 (1)
7	4,0 (-1)	7,5 (1)	1,0 (1)
8	10,0 (1)	7,5 (1)	1,0 (1)
9	7,0 (0)	5,5 (0)	0,5 (0)
10	7,0 (0)	5,5(0)	0,5 (0)
11	7,0 (0)	5,5 (0)	0,5 (0)

Fonte: Autor

Legenda: O primeiro número representa os valores estudados enquanto os números entre parênteses, representam os níveis do planejamento fatorial.

Após estudar o planejamento fatorial, foi realizado um estudo utilizando a matriz de Doehlert, a fim de se estudar as variáveis em mais níveis. A tabela 4 apresenta os níveis codificados e reais da matriz para 3 fatores.

Tabela 4 - Níveis codificados e reais da Matriz de Doehlert para 3 fatores empregada na otimização do sistema de pré-concentração *on-line* de Cu²⁺ em fibra RAIP-BSA.

Fatores	Níveis Codificados e Reais					
VP (mL min ⁻¹)	(-1)	(-0,5)	(0)	(0,5)	(1)	
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	
pH	(-0,866)	(-0,577)	(-0,289)	(0)	(0,289)	(0,577)
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
CE (mol L ⁻¹)		(-0,817)	(0)	(0,817)		
		0,5	1,0	1,5		

Fonte: Autor

4.8 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO

O estudo de interferentes é utilizado para avaliar a seletividade do método utilizado. Uma vez que na matriz estudada, além de ter o analito de interesse, há também a presença de outros componentes que podem afetar ou não nos resultados obtidos, a seletividade determina a capacidade do método em detectar o analito em estudo mesmo com outros componentes presentes na matriz.¹¹⁴

A influência dos interferentes/íons concomitantes, foi analisada através da comparação dos sinais analíticos obtidos para os interferentes mais analito e o sinal obtido para uma solução contendo somente o íon de interesse (Cu^{2+}). As análises foram realizadas de acordo com as condições já otimizadas e utilizando soluções binárias contendo Cu^{2+} com concentração de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e sais de CaCl_2 (1000 mg.L^{-1}), NaNO_3 (700 mg.L^{-1}), NaCl (1030 mg.L^{-1}), KCl (1450 mg.L^{-1}), MgCl_2 ($1,1 \times 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$), Fe ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e Zn ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$)^{115,116}. Para cálcio e sódio, as concentrações estabelecidas são as indicadas nas tabelas nutricionais das caixas de leite utilizadas neste estudo. Para atestar a seletividade do RAIIP-BSA, as análises também foram realizadas utilizando o RANIP-BSA, material esse que não apresenta seletividade a um íon específico. Considerou-se que recuperações entre 85 e 115% indicam a não interferência dos elementos.

4.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação foram avaliados. Estes estudos foram realizados usando amostras de leite UHT semidesnatado, enriquecidas com Cu^{2+} em concentrações que variaram de $0,05$ a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$

A linearidade e sensibilidade, foram expressas como o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente angular da curva de calibração, respectivamente. Estes parâmetros foram estabelecidos através da curva de calibração (em sextuplicata) do analito em sete concentrações diferentes ($0,05$; $0,1$; $0,25$; $0,4$; $0,5$; $0,75$; $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

A precisão intra-dias foi avaliada por meio de seis replicatas em três níveis de concentração ($0,05$; $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), no mesmo dia. A precisão inter-dias foi avaliada em seis replicatas, analisadas em três níveis de concentração ($0,05$, $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em três dias diferentes. Os resultados foram expressos pro meio do coeficiente de variação.

A exatidão intra-dias foi estudada por meio de seis réplicas em três níveis de concentração (0,05; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) e a inter-dias foi avaliada da mesma forma, porém em três dias diferentes. Para estes testes foi utilizado o método de adição e recuperação e os resultados obtidos foram expressos em termos de recuperação.

Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) foram calculados experimentalmente, obtendo-se a melhor concentração com exatidão e precisão para o LoQ e a menor concentração detectável, diferente do ruído, para o LoD.

5 RESULTADOS

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO DE IMPRESSÃO IÔNICA DE ACESSO RESTRITO (RAIP-BSA)

O método utilizado para a obtenção do IIP foi o *in bulk*^{18,40}. Este método foi escolhido principalmente por sua simplicidade e porque quando se trabalha com sistemas empacotados, nos quais a amostra e o eluente fluem pela coluna contendo o material, geralmente opta-se por partículas de maior tamanho, pois ao trabalhar com partículas em escala nanométrica, a restrição de fluxo é maior, gerando problemas como entupimento, dificuldade de empurrar a amostra pela coluna e aumento de pressão no sistema.

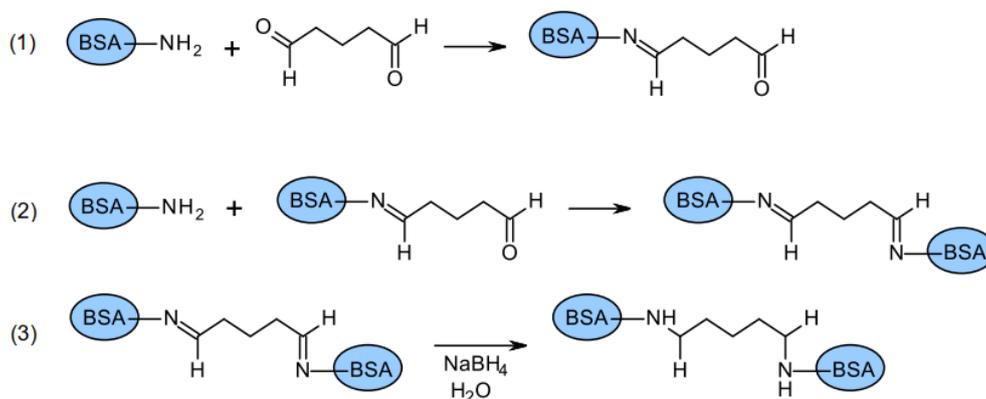
Na síntese ocorre a interação ácido-base entre o íon metálico (Cu^{2+}) com a parte básica da molécula do monômero funcional (4-vinilpiridina), por meio de ligações coordenadas.¹¹⁷ A adição do agente de ligação cruzada (EGDMA) apresenta três funções: i) controle da morfologia da matriz; ii) estabilidade do sítio de ligação impresso iii) estabilidade mecânica à matriz; além disso, o EGDMA é amplamente utilizado devido à formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e rápida transferência de massa.⁶⁹ O iniciador radicalar (A4-CA), por meio do aquecimento, sofre quebra homolítica em sua estrutura e gera radicais que são responsáveis por iniciar a polimerização.⁶⁹ O solvente utilizado (acetonitrila), que não deve interferir na formação do complexo, é responsável pelas características morfológicas e porosidade do material.⁶⁴ Por fim, o co-monômero hidrofílico (GMA) é usado para modificar quimicamente a superfície do polímero e assim, obter um material de acesso restrito (RAIP).²⁴ Após a polimerização, o Cu^{2+} foi removido da matriz polimérica por meio da lavagem com água, revelando os sítios de ligação seletivos que apresentam tamanho e forma complementares ao do analito.

O próximo passo foi a abertura do anel epóxido do GMA com o auxílio do ácido perclórico, sendo essa abertura responsável pela criação de uma camada hidrofílica e obtenção do polímero de impressão iônica de acesso restrito - RAIP. Após deixar o material em contato com o ácido sob agitação por 24h, ele foi lavado com água até obter pH neutro e colocado em estufa por 12h. Embora a adição de co-monômeros hidrofílicos já garanta uma proteção contra a adsorção de proteínas, essa proteção é cerca e 87%, conforme relatado no trabalho Santos *et al.*⁹¹ Sendo assim, a adição de mais uma camada

hidrofílica, por meio do recobrimento com BSA, garante uma eliminação de proteínas de praticamente 100%, o que é o ideal.

Assim, após secagem, cerca de 500mg do material foram recobertos com uma camada de albumina sérica bovina (BSA), segundo a metodologia proposta por Moraes *et al.*¹⁰⁷ O glutaraldeído é usado para entrecruzar as proteínas, fazendo com que seus grupos aldeídos se liguem aos grupos amins da BSA, fazendo a ligação de BSA com BSA e formando uma cápsula/película sobre o material. Na figura 10 é possível observar as reações que ocorrem entre a BSA e o glutaraldeído. Como a interação entre a BSA e o glutaraldeído resulta na formação de iminas, compostos pouco estáveis, utiliza-se uma solução de borohidreto 1% que tem por objetivo reduzir iminas em amins que são compostos estáveis. O material então é lavado com água para retirar resíduos da síntese obtendo um RAIP-BSA, fazendo com que haja uma exclusão mais efetiva de proteínas.^{70,83}

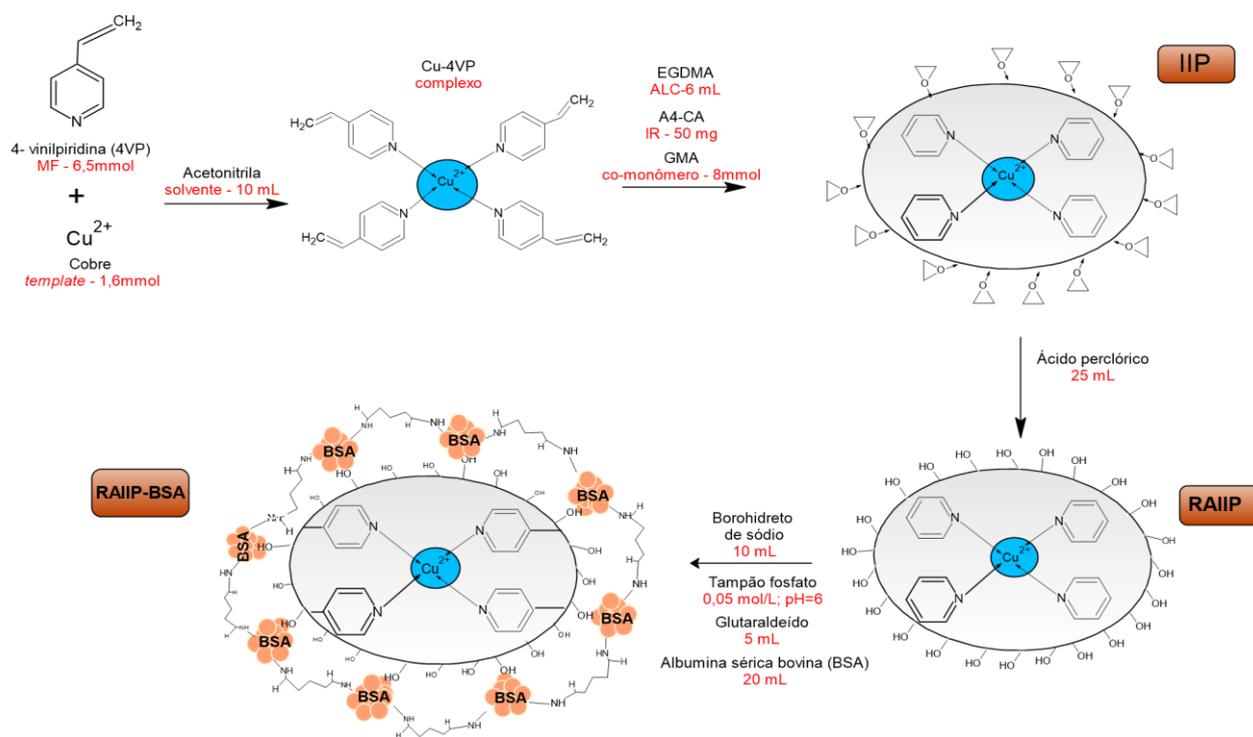
Figura 10- Esquema de reações que ocorrem no processo de revestimento com BSA



Fonte: SANTOS (2015).

Na primeira etapa, ocorre a reação entre o aldeído do glutaraldeído e a amina da BSA. Na 2ª, ocorre a formação da rede de BSA em volta dos polímeros devido à reação entre a amina da outra molécula de albumina e o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído. E por fim, na etapa 3, o borohidreto é adicionado e converte as iminas em amins. A figura 11 representa o esquema de síntese do RAIP-BSA.

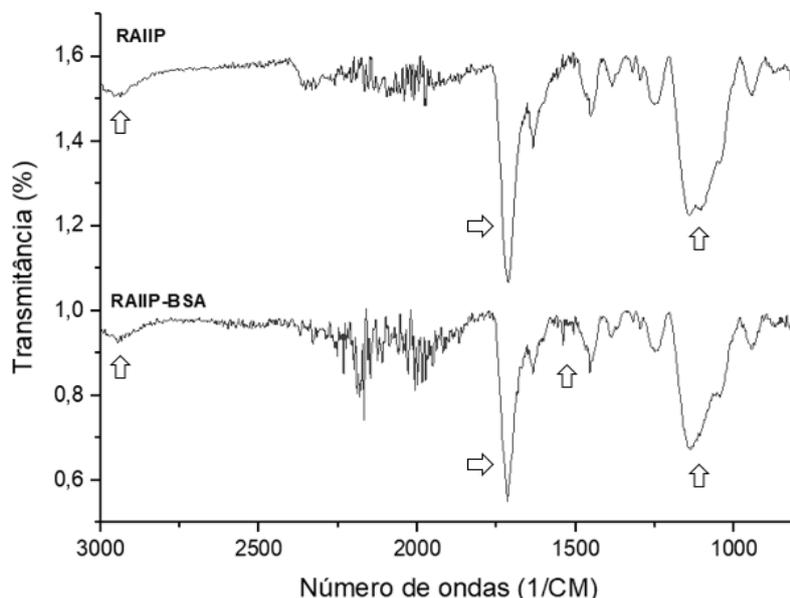
Figura 11 - Esquema de síntese do RAIIP-BSA



Fonte: Autor

Após todo o processo de síntese, foi realizada a caracterização do material. Para tal, foram utilizadas as seguintes técnicas: FT-IR e a termogravimetria. A figura 12 apresenta os espectros na região do infravermelho para os RAIIP e RAIIP-BSA, respectivamente.

Figura 12 - Espectros de FT-IR para RAIIP e RAIIP-BSA

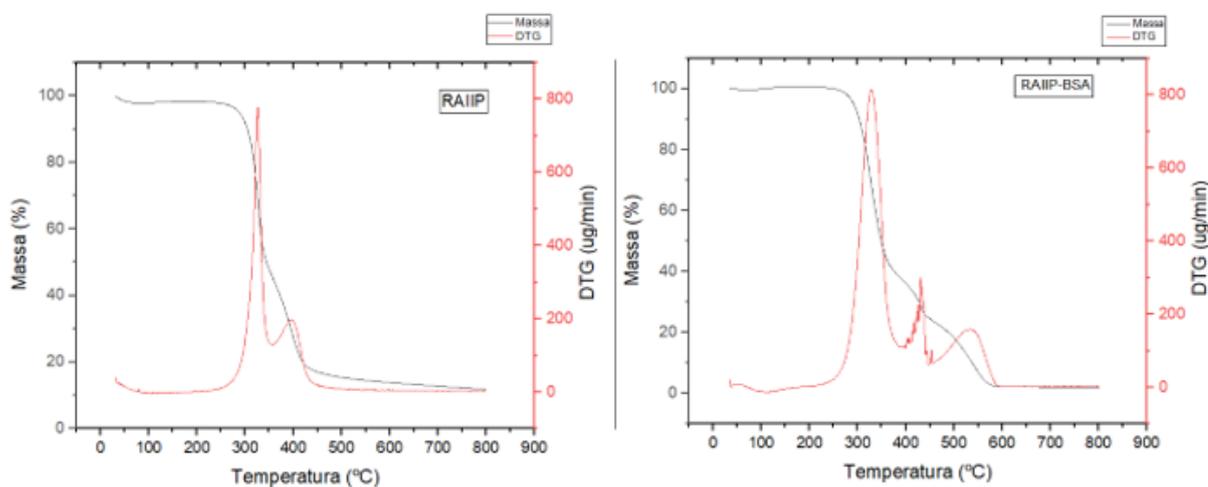


Fonte: Autor

Devido à grande variedade de ligações que se encontram na mesma região, não foi possível observar diferenças significativas entre o RAIP e o RAIP-BSA nos espectros do FT-IR. Além disso, essa similaridade comprova que o material não fica comprometido após revestimento com a BSA, ou seja, não altera sua estrutura química. No entanto, os dois polímeros apresentaram bandas entre 3000 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , indicando a presença de C-H alifáticos, bandas em 1635 cm^{-1} aproximadamente, indicando a presença de grupamentos vinila provenientes do EGDMA e da 4-vinilpiridina e bandas em aproximadamente 1160 cm^{-1} indicando a presença de C-O. O RAIP-BSA, apresenta uma banda discreta em torno de 1550 cm^{-1} que indica a presença da amida II (N-H), podendo ser do revestimento com a BSA. Vale ressaltar que os grupamentos relativos às amidas podem ser mascarados pela 4-vinilpiridina, devido às suas bandas serem próximas às da BSA.

A figura 13 apresenta as curvas de perda de massa para RAIP e RAIP-BSA. Para o RAIP há uma perda de cerca de 90% de massa total e pela DTG observa-se dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro provavelmente relativo à eliminação da água e o segundo referente à degradação da cadeia polimérica. Já o RAIP-BSA, demonstrou uma perda total (100%) de sua massa, sendo indicativo de que a BSA foi incorporada ao RAIP, pois a mesma favorece a degradação do material devido à degradação da proteína.. Ademais, é possível perceber pela DTG, que o RAIP-BSA apresenta 3 eventos de perda de massa, sendo o terceiro evento referente à degradação da BSA, o que corrobora com a incorporação do revestimento ao material. Vale ressaltar que todos os materiais analisados apresentam elevada estabilidade térmica.

Figura 13 - Curvas de perda de massa para RAIP e RAIP-BSA



Fonte: Autor

5.2 CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

Os dados experimentais obtidos para a cinética de adsorção foram avaliados segundo os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção (Elovich) e ordem fracionária, de acordo com os valores obtidos de R^2 e função erro (F_{error}). Quanto mais próximo o valor de R^2 for de 1,00, maior é a proximidade dos dados obtidos à linha de regressão. A função erro, foi calculada pela equação (2) onde n é o número de experimentos, p é o número de parâmetros do modelo, $q_{i,exp}$ é o valor de q medido experimentalmente e $q_{i,teórico}$ é o valor de q previsto pelo modelo. Tal equação correlaciona os dados obtidos experimentalmente com aqueles calculados após o ajuste ao modelo, assim quanto menores os valores obtidos, menor a diferença entre os dados experimentais e teóricos.¹¹⁸

$$F_{error} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-p}\right) \sum_i^n (q_{i,exp} - q_{i,teórico})^2} \quad (2)$$

Os dados se ajustaram melhor ao modelo de pseudo-primeira ordem, uma vez que o R^2 foi maior e o F_{error} menor, como pode ser observado na tabela 5. O tempo de equilíbrio se estabeleceu com 10 minutos, como mostra a figura 14.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para adsorção de Cu^{2+} em RAIP-BSA ajustado para os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.

Modelos cinéticos	Equação	Parâmetro	Dados
		q_e (mg g ⁻¹)	0,04316
Pseudo-primeira	$q_t = q_e [1 - \exp(-k_1 t)]$	k_1 (min ⁻¹)	0,18394
Ordem		R^2	0,96249
		F_{error}	0,00266
		q_e (mg g ⁻¹)	0,04814
Pseudo-segunda	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	K_2 (min ⁻¹)	5,12360
Ordem		R^2	0,92755
		F_{error}	0,00370
		N	0,03038
Quimissorção	$q_t = \frac{1}{k} \ln(n k) + \frac{1}{k} \ln(t)$	K (min ⁻¹)	110,933
		R^2	0,92755
		F_{error}	0,00521
		q_e (mg g ⁻¹)	0,04287
Ordem Fracionária	$q_t = q_e [1 - \exp(-k t)^n]$	K (min ⁻¹)	0,18325
		N	1,19347
		R^2	0,95830
		F_{error}	0,06974

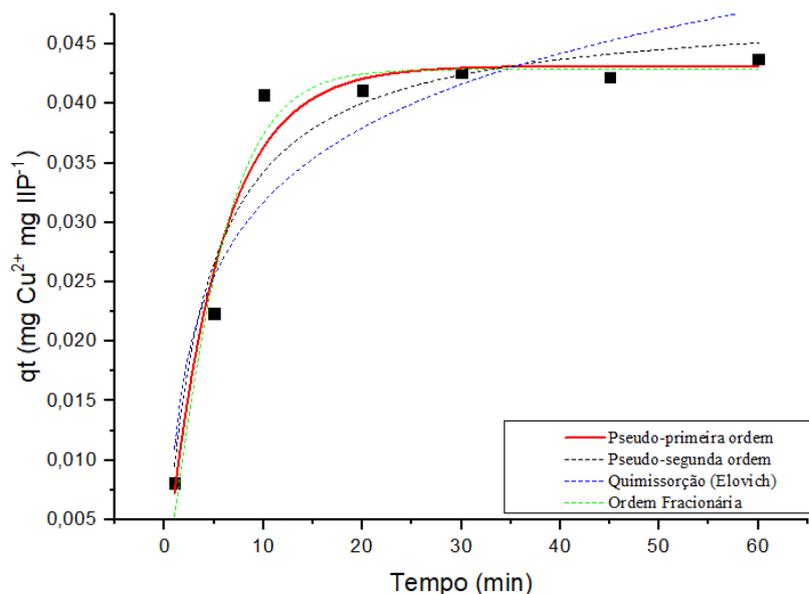
Fonte: Autor.

Legenda: q_t : quantidade de analito adsorvido no tempo t ; q_e : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; t : tempo de contato; k_1 : constante de velocidade de pseudo-primeira ordem; k_2 : constante de velocidade de pseudo-segunda ordem; n : reação de ordem fracionária relacionada ao mecanismo de adsorção.

No modelo de pseudo-primeira ordem supõe-se que não ocorre a troca ou partilha entre os elétrons do adsorvente e do metal, além disso a adsorção dos íons independe da concentração do adsorvato e é controlada prioritariamente por difusão externa. Considera-se que o número de sítios livres é proporcional a velocidade de adsorção, o que

caracteriza um processo de fisissorção, ou seja, um processo físico, sendo provavelmente uma atração eletrostática dos íons de Cu^{2+} pelo RAIP-BSA^{118,119}.

Figura 14 - Cinéticas de adsorção do RAIP-BSA adequadas aos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.



Fonte: Autor

Em relação à isoterma de adsorção, os dados foram avaliados de acordo com os modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Redlich-Peterson e Toth. De maneira análoga ao que foi feito para a cinética de adsorção, o R^2 e o F_{error} foram usados para verificar o melhor ajuste. Foi possível observar que o modelo de Sips apresentou o melhor ajuste, visto que o R^2 foi maior e o F_{error} menor como pode ser observado na tabela 6. A concentração de equilíbrio se dá a partir de 200 mg.L^{-1} de Cu^{2+} , como pode ser observado na figura 15.

Tabela 6 - Parâmetros das isotermas de adsorção de cobre em RAIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich Peterson

Modelo de isoterma	Equação	Parâmetro	Dados
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + b C_e}$	q_s (mg g ⁻¹)	53,915
		K_L (mg L ⁻¹)	0,0166
		R^2	0,9626
		F_{error}	3,3156
		K_F (mg.g ⁻¹) (mg.L ⁻¹) ⁿ	3,8898
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/ns}$	n_F	2,4977
		R^2	0,8402
		F_{error}	10,073
		q_s (mg.g ⁻¹)	46,468
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/ns}}{1 + a_s C_e^{1/ns}}$	K_s (mg.L ⁻¹)	7,02 ⁻⁴
		N_s	2,0150
		R^2	0,9974
		F_{error}	0,8970
		q_s	85,034
Khan	$q_e = \frac{q_s b_K C_e}{(1 + b_K C_e)^2 K}$	a_K	1,3142
		b_K	0,0077
		R^2	0,9835
		F_{error}	2,3644
		K_t	3,2192
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_T + C_e)^{1/t}}$	A_t	-0,2436
		R^2	0,8045
		F_{error}	8,1175
		K_R (g.L ⁻¹)	0,8980
Redlich Peterson	$q_e = \frac{K_e C_e}{1 + a_R C_e^g}$	a_R (mg.L ⁻¹)	0,0166
		g (0 ≤ g ≤ 1)	1,0
		R^2	0,9565
		F_{error}	3,7424

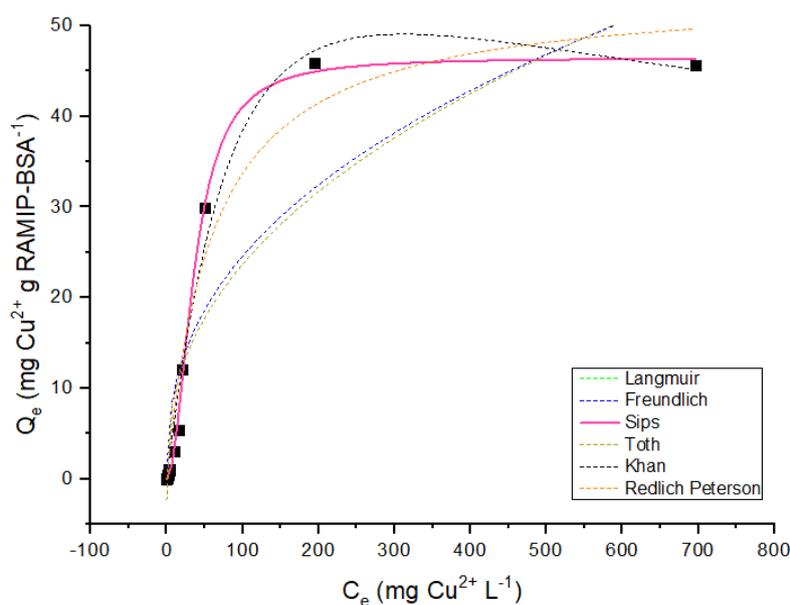
Fonte: Autor

Legenda: q_e : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; q_s : capacidade de saturação teórica; K_L : constante de afinidade de Langmuir; C_e : concentração de analito no equilíbrio; K_F e n_F : constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e n_s : constante e expoente do

modelo de Sips, respectivamente; aK e bK : constante e expoente do modelo de Khan, respectivamente K_T e aT : constantes da isoterma de Toth; t : expoente do modelo de Toth; KR e aR : constantes do modelo de Redlich-Peterson; g : expoente do modelo de Redlich-Peterson;

O modelo Sips é uma combinação entre os modelos de Langmuir e Freundlich, sendo utilizado para: i) desviar da limitação da concentração crescente de adsorbato do modelo de Freundlich e ii) antever sistemas heterogêneos de adsorção. Quando há altas concentrações do adsorbato, a adsorção ocorre em monocamada, sendo essa característica da isoterma de Langmuir. Já a adsorção em baixas concentrações é mais bem descrita pela isoterma de Freundlich, que indica que a adsorção dos analitos se dá sob uma superfície heterogênea com a formação de multicamadas^{120,121}.

Figura 15 - Isothermas de adsorção do RAIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich Peterson.



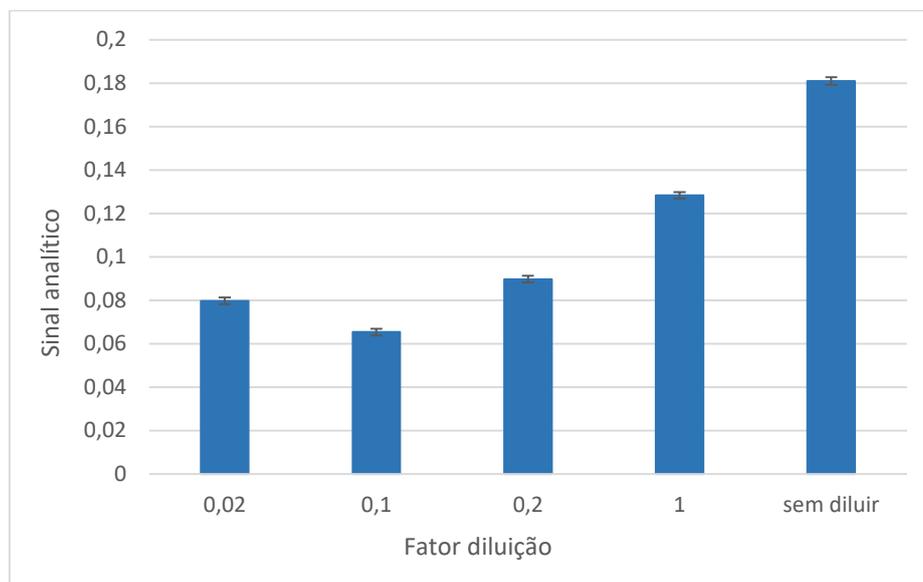
Fonte: Autor

5.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Com a finalidade de melhorar o método analítico, normalmente estuda-se as variáveis que exibem efeito significativo e que podem ser ajustadas para obter-se melhores resultados. Muitas vezes em um sistema, diversos fatores ou variáveis podem influenciar na resposta desejada, dessa forma, um experimento para triagem é executado a fim de determinar quais variáveis são significativas dentro do domínio experimental.¹⁰⁴

Primeiramente, foi realizado uma triagem, utilizando a amostra de leite, para avaliar o fator de diluição, volume e tipo de eluente. Para o fator de diluição, avaliou-se quatro condições na proporção leite: água: 1:50; 1:10; 1:5; 1:1 e sem diluir, nas seguintes condições: concentração de Cu^{2+} $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, eluente: $\text{HCl } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, vazão de pré-concentração e eluição: $5,5 \text{ mL.min}^{-1}$, pH da amostra: 7 e volume da amostra: 20 mL. Através dos resultados obtidos, plotou-se um gráfico – figura 16- para obter a melhor condição de diluição.

Figura 16 - Otimização univariada para diluição da amostra

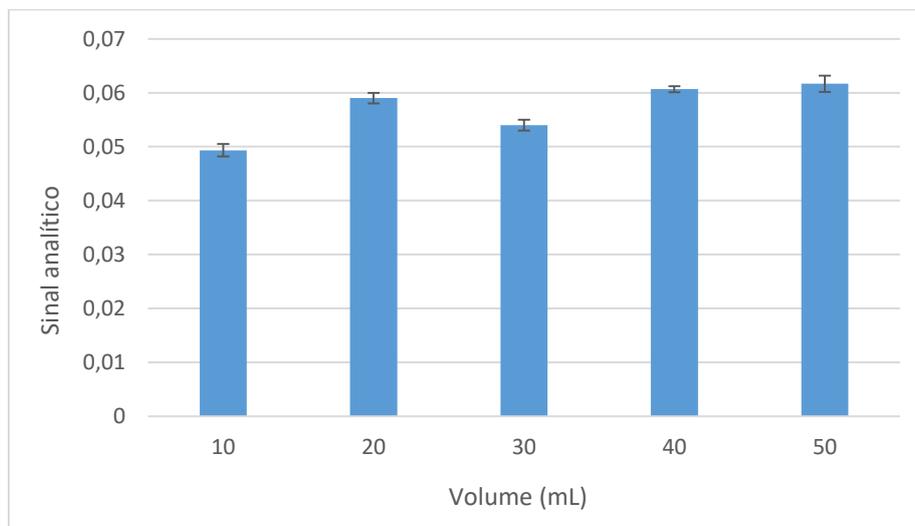


Fonte: Autor

De acordo com os dados obtidos, o melhor sinal analítico foi referente à amostra sem diluir e, diante disso, optou-se por realizar as demais etapas sem realizar a diluição do leite.

Posteriormente, o volume de amostra para a pré-concentração na coluna foi avaliado. Para isso, os volumes de 10, 20, 30, 40 e 50 mL foram analisados. As condições de análise foram as mesmas citadas acima, exceto pelo volume da amostra e pela concentração de Cu^{2+} que foi de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Essa alteração na concentração foi necessária, pois testes realizados anteriormente mostraram um coeficiente de variação muito alto entre as extrações, podendo ser devido ao elevado teor de Cu^{2+} que poderia estar saturando a capacidade máxima adsorptiva do material ao passar volumes maiores de amostra. Os resultados obtidos são apresentados na figura 17.

Figura 17 – Otimização univariada para volume da amostra



Fonte: Autor

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que não houve uma alteração significativa no sinal ao se variar o volume da amostra. Apesar do maior volume (50 mL) apresentar um sinal um pouco superior ao restante, optou-se por utilizar 20 mL, que apresentou sinal próximo e que possibilita uma maior frequência analítica. Por fim, para o tipo de eluente, testou-se dois: HNO_3 e HCl , ambos em concentrações de 1,0 e 0,1 mol.L^{-1} . Após os testes, observou-se que os sinais analíticos obtidos para o HCl 1,0 mol.L^{-1} foram maiores que para HNO_3 e HCl 0,1 mol.L^{-1} .

Definidas estas variáveis, o planejamento fatorial multivariado foi estudado novamente a fim de analisar as melhores condições de extração para o leite, considerando amplas faixas de pH, vazão de pré-concentração e concentração do eluente. As condições de análise foram: leite sem diluição, 20 mL de amostra, concentração de Cu^{2+} de 1,0 mg.L^{-1} e vazão de eluição de 5,5 mL.min^{-1} . Os resultados obtidos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do planejamento fatorial para três variáveis

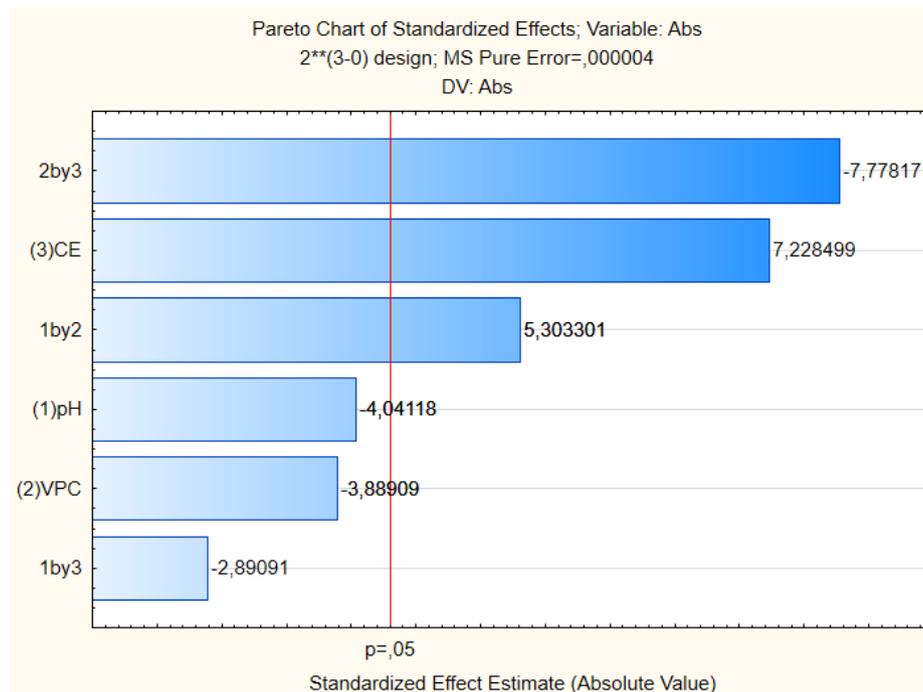
Experimentos	VP (mL.min⁻¹)	pH	Concentração do eluente (mol.L⁻¹)	Resultados
1	3,0 (-1)	4,0 (-1)	0,1 (-1)	0,113
2	3,0 (-1)	10,0 (1)	0,1 (-1)	0,112
3	7,5 (1)	4,0 (-1)	0,1 (-1)	0,104
4	7,5 (1)	10,0 (1)	0,1 (-1)	0,116
5	3,0 (-1)	4,0 (-1)	1,0 (1)	0,140
6	3,0 (-1)	10,0(1)	1,0 (1)	0,115
7	7,5 (1)	4,0(-1)	1,0 (1)	0,121
8	7,5 (1)	10,0 (1)	1,0 (1)	0,113
9	5,5 (0)	7,0 (0)	0,5 (0)	0,129
10	5,5(0)	7,0 (0)	0,5 (0)	0,131
11	5,5 (0)	7,0 (0)	0,5 (0)	0,127

Fonte: Autor

Legenda: O primeiro número representa os valores estudados enquanto os números entre parênteses representam os níveis do planejamento fatorial.

Em seguida, por meio dos resultados, foi realizado a investigação da significância dos efeitos estudados bem como suas interações ao nível de 95% de confiança a partir do diagrama de Pareto. A magnitude dos contrastes foi representada por colunas, e a linha vertical indica a significância estatística para $p=0,05$, ou seja, as variáveis com valores que ultrapassem a linha vertical são estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%.¹¹⁴ Os dados experimentais foram processados usando-se o programa *STATISTICA 10* (StatSoft, Tulsa, USA) e os resultados são apresentados no diagrama de Pareto na figura 18.

Figura 18 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para as variáveis do sistema de determinação on-line de cobre em leite



Fonte: Autor

Legenda: (1) pH da amostra; (2) vazão de pré-concentração; (3) concentração do eluente; (1by2) interação entre as variáveis (1) e (2); (1by3) interação entre as variáveis (1) e (3); (2by3) interação entre as variáveis (2) e (3).

De acordo com o gráfico, a única variável significativa, ou seja, a que apresentou influência na resposta analítica obtida foi a concentração do eluente ($>0,05$). Esta variável apresentou um efeito positivo, indicando que a maior concentração do eluente foi a que apresentou a melhor resposta analítica. Dessa forma, a melhor concentração a ser utilizada seria a de 1,0 M. Já o pH e vazão de pré-concentração, isoladamente, não apresentaram significância ($<0,05$). No entanto, ao se analisar as interações entre as variáveis, observou-se que a 2x3 (vazão de pré-concentração x concentração do eluente) apresentou um efeito negativo significativo, assim como a interação 1x2 (pH da amostra x vazão de pré-concentração), porém com efeito positivo.

Neste sentido, a fim de se estudar essas variáveis em mais níveis e obter a condição experimental com maior resposta analítica, optou-se por utilizar matriz de Doehlert. A tabela 8 mostra os resultados obtidos.

Tabela 8 - Matriz de Doehlert com 3 fatores para a otimização do sistema de pré-concentração on-line de Cu^{2+} em RAIP-BSA

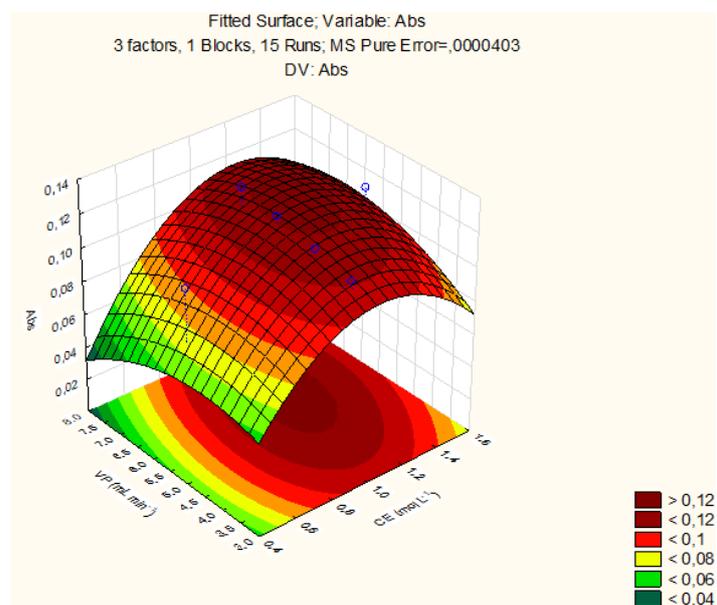
Experimentos	VP ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	pH	C.E ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Resultados
1	5,5 (0)	7,0 (0)	1,0 (0)	0,124/0,124/0,113
2	7,5 (1)	7,0 (0)	1,0 (0)	0,108
3	5,5 (0,5)	10,0 (0,866)	1,0 (0)	0,109
4	6,5 (0,5)	8,0 (0,289)	1,5 (0,817)	0,107
5	3,5 (-1)	7,0 (0)	1,0 (0)	0,113
6	4,5 (-0,5)	4,0 (-0,866)	1,0 (0)	0,118
7	4,5 (-0,5)	6,0 (-0,289)	0,5 (-0,817)	0,059
8	6,5 (0,5)	4,0 (-0,866)	1,0 (0)	0,128
9	6,5 (0,5)	6,0 (-0,289)	0,5 (-0,817)	0,055
10	4,5 (-0,5)	10,0 (0,866)	1,0 (0)	0,109
11	5,5 (0)	9,0 (0,577)	0,5 (-0,817)	0,105
12	4,5 (-0,5)	8,0 (0,286)	1,5 (0,817)	0,097
13	5,5 (0)	5,0 (-0,577)	1,5 (0,817)	0,119

Fonte: Autor

Legenda: O primeiro número representa os valores reais, enquanto os números entre parênteses representam os valores codificados da matriz Doehlert.

Após obtenção dos resultados, estes foram tratados e avaliados pelo *software STATISTICA 10* (StatSoft, Tulsa, USA), e as figuras 19, 20 e 21 mostram as superfícies de resposta para C.E x VP, C.E x pH e VP x pH respectivamente.

Figura 19 - Superfície de resposta da C.E x VP

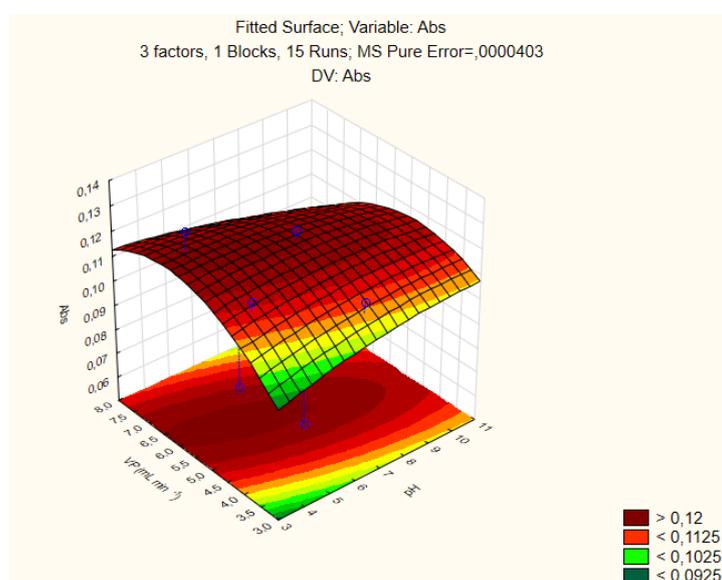


Fonte: Autor

Na superfície de resposta, sabe-se que os valores que se encontram no interior da superfície (região vermelha), são os que apresentam o melhor sinal/resposta, enquanto aqueles que se encontram mais nas extremidades (região verde), apresentam menor sinal/resposta. Dessa forma, a relação VP x CE, interação mais significativa, mostra que a melhor condição é VP= 5,5 mL.min⁻¹ e C.E = 1,0 mol.L⁻¹.

Já para VP x pH, como mostra a figura 20, tem-se duas vazões na região de maior resposta: 5,5 e 6,5 mL.min⁻¹ e três valores de pH: 7,0; 5,0 e 4,0.

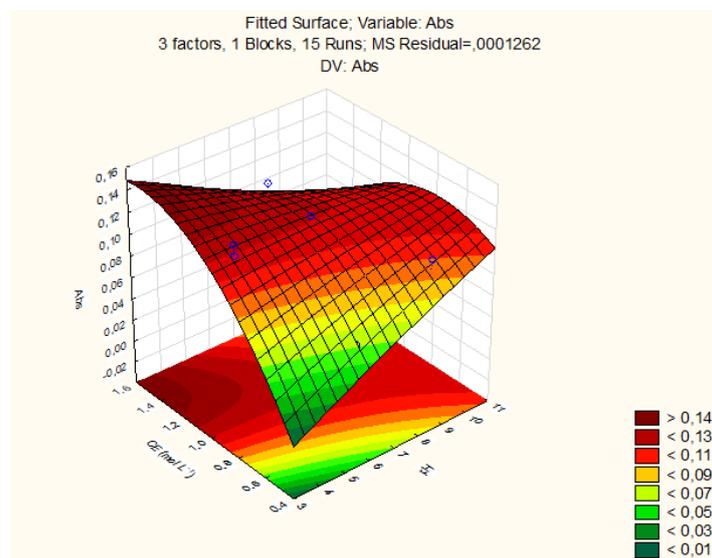
Figura 20 - Superfície de resposta para VP x pH



Fonte: Autor

E por fim, para pH x CE – figura 21- notou-se que os valores de pH= 7,0 e 5,0 permaneceram na região vermelha e a CE de 1,5 e 1,0 mol.L⁻¹.

Figura 21 - Superfície de resposta para CE x pH



Fonte: Autor

Para definir as melhores condições de análise, deve-se observar o efeito das variáveis no sistema como um todo. Para o pH, observou-se que os valores de 4,5 e 7,0 encontravam-se dentro da região de melhor resposta analítica. Para sua determinação, foi levado em consideração que o pH 4,0 é um valor que está abaixo do ponto isoelétrico da caseína – proteína majoritária do leite – fazendo com que a mesma precipite e dificulte as análises, não sendo uma condição ideal. Apesar do pH 5,0 apresentar sinal analítico adequado, optou-se por escolher o pH 7,0, pois é um valor que necessita de pequenas adições de NaOH – menor manipulação da amostra- uma vez que o pH do leite é 6,5. Para a concentração do eluente, os valores de 1,0 e 1,5 mol.L⁻¹ apresentaram as melhores respostas analíticas, porém como o trabalho vai frente à química verde, onde a proposta é utilizar menores quantidades de ácidos e solventes orgânicos, além de se trabalhar com concentrações mais baixas, optou-se por utilizar a concentração de 1,0 mol.L⁻¹. Por fim, para a vazão de pré-concentração, optou-se por trabalhar com a vazão de 5,5 mL.min⁻¹, pois, a interação VP x CE - a mais significativa - indica que a VP= 5,5 mL.min⁻¹ e CE= 1,0 mol.L⁻¹ é onde se obtém a melhor resposta analítica.

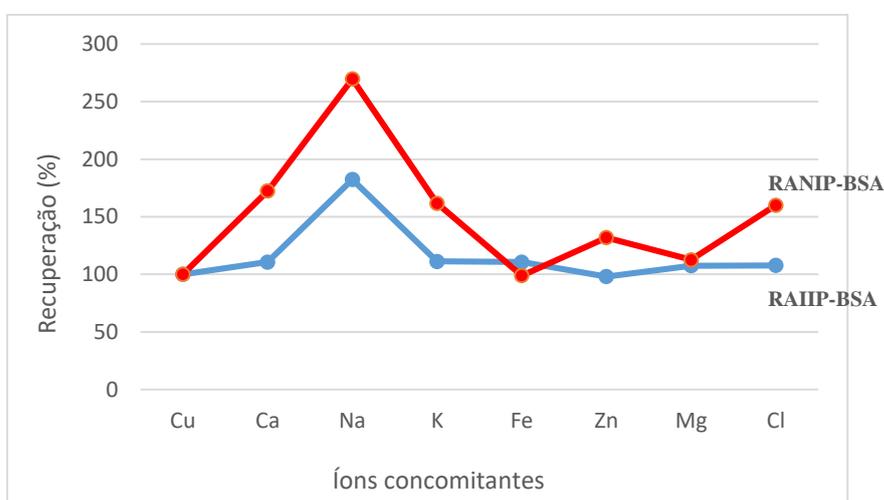
Diante disso, concluiu-se que as melhores condições para as análises posteriores seriam: pH da amostra: 7,0; volume da amostra: 20 mL; vazão de pré-concentração: 5,5 mL.min⁻¹; diluição da amostra: sem diluir e concentração do eluente: 1,0 mol.L⁻¹.

5.4 ESTUDOS DA SELETIVIDADE DO MÉTODO

Nas análises envolvendo materiais adsorptivos, a seletividade é uma propriedade a ser considerada, pois dependendo da interação do adsorvente com os íons metálicos, pode haver uma retenção considerável dos íons concomitantes e assim interferir na retenção do íon de interesse.¹¹⁰

As análises foram realizadas de acordo com as condições já otimizadas e utilizando soluções binárias contendo Cu²⁺ com concentração de 0,2 mg.L⁻¹ e os interferentes. A figura apresenta os resultados para os interferentes estudados e o percentual de recuperação comparado com a solução contendo apenas Cu²⁺. Os valores variaram de 97,9% a 182,3% para o RAIP-BSA e de 98,8 a 269,6% para o RANIP-BSA.

Figura 22 - Efeito dos íons concomitantes na recuperação do sinal analítico de Cu²⁺ para RAIP-BSA e RANIP-BSA



Fonte: Autor

Considerando que valores de recuperação entre 85 e 115% indicam pouca interferência na pré-concentração de Cu²⁺, observou-se que dentre os íons estudados, apenas o Na²⁺ interferiu na pré-concentração do analito pelo RAIP-BSA. Comparando os resultados obtidos para RAIP-BSA e RANIP-BSA, é possível observar que o efeito dos interferentes é mais pronunciado quando se utiliza o material não impresso. Tal

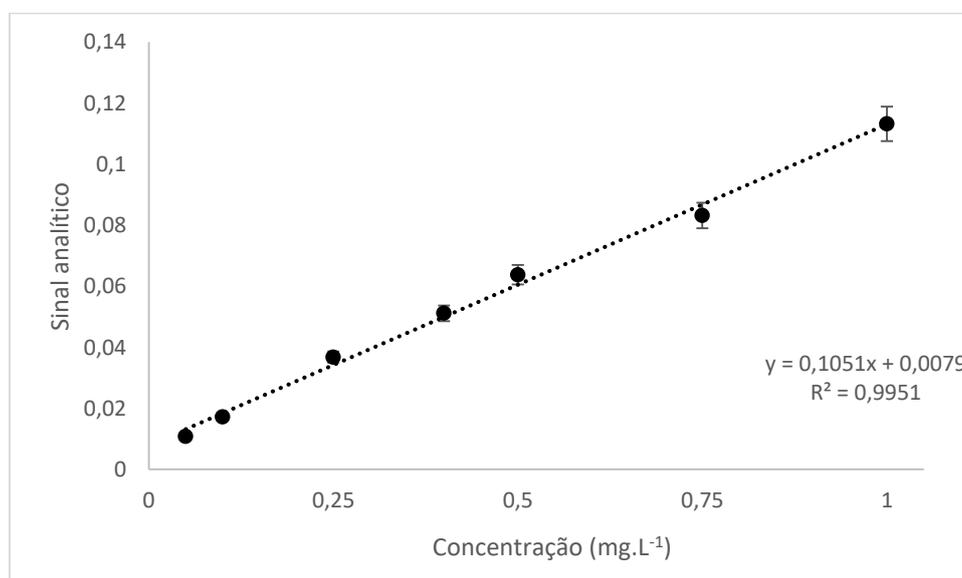
resultado comprova que o polímero impresso se liga preferencialmente ao cobre em detrimento dos interferentes, o que não ocorre com o polímero não impresso.

5.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Após otimizar as condições, avaliou-se o desempenho do método por meio dos parâmetros de faixa linear, precisão intra e inter-dias, exatidão relativa inter e intra-dias, limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ).

A faixa linear é a faixa de concentração do analito no qual o método fornece resultados proporcionais entre a absorbância e concentração do analito.¹²³ Para escolha da faixa linear, foi levado em consideração os limites estabelecidos pelas organizações internacionais, ATSDR e JETRO – 0,3 e 0,6 mg.L⁻¹ – que estabelecem valores menores que a ANVISA – 2,0 mg.L⁻¹.¹⁰ Assim, o método foi linear em uma faixa de 0,05 a 1,0 mg.L⁻¹, apresentando um coeficiente de determinação de 0,9951 e equação de regressão linear $ABS = 0,1051 [Cu^{2+}] + 0,0079$. A figura 23 ilustra a curva de calibração obtida para o sistema de pré-concentração.

Figura 23 - Curva de calibração para o sistema de pré-concentração em coluna



Fonte: Autor

Os valores de precisão e exatidão intra e inter-dias foram adequados, apresentando intervalos de coeficiente de variação de 0,3 a 4,14% e 0,16 a 3,86% para precisão intra e inter-dias, respectivamente e de percentual de recuperação de 97,05 a 115,1% e 103,06 a

119,6% para exatidão intra e inter-dias, respectivamente. Os valores obtidos em cada nível de concentração avaliados podem ser visualizados na tabela 9.

O limite de quantificação (LoQ) é a menor concentração que pode ser quantificada pelo método com precisão e exatidão e o limite de detecção (LoD) é a menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra, mas não necessariamente quantificada com exatidão. Há várias maneiras de se calcular LoQ e LoD, no entanto, por se tratar de um método aplicado a uma matriz complexa, optou-se por determinar esses limites experimentalmente, diminuindo a concentração de analito na matriz progressivamente, até que os limites fossem atingidos. Assim LoQ e LoD foram, respectivamente 0,05 e 0,03 mg.L⁻¹.

Um ponto muito importante a ser mencionado é a durabilidade da coluna de RAIIP-BSA. Uma mesma coluna pôde ser utilizada por 130 vezes (130 extrações) sem que houvesse prejuízo da exatidão ou precisão das análises. Além disso, como o método utilizado – *in bulk* – tem como resultado partículas maiores de polímero, problemas como pressão do sistema, ao passar a amostra de leite, não ocorreram.

A tabela 9 sumariza os dados obtidos com a validação.

Tabela 9 - Figuras de mérito

Faixa linear (mg.L ⁻¹)	0,05 - 1,0		
Limite de Detecção (mg.L ⁻¹)	0,03		
Limite de Quantificação (mg.L ⁻¹)	0,05		
Precisão intra-dias % RSD (n=6)	4,14 ^a	2,04 ^b	0,73 ^c
Precisão inter-dias % RSD (n=3)	3,68 ^a	0,30 ^b	0,16 ^c
Exatidão intra-dias R% (n=6)	97,0 ^a	115,0 ^b	102,8 ^c
Exatidão inter-dias E% (n=3)	111,8 ^a	119,1 ^b	103,0 ^c
^a 0,05 mg.L ⁻¹ , ^b 0,5 mg.L ⁻¹ , ^c 1,0 mg.L ⁻¹			

Fonte: Autor

5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método, cinco amostras de leite foram estudadas nas condições otimizadas e validadas, sem adição de Cu²⁺. Inicialmente ajustou o pH das amostras e então foi realizada a pré-concentração e extração de Cu²⁺ através do sistema FIA-FAAS. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10 - Concentração de Cu^{2+} encontrada em amostras de leite do comércio de Alfenas e região

Amostra de leite	Concentração de Cu^{2+} determinada (mg.L^{-1})
1	<LoD
2	<LoQ
3	0,061
4	0,210
5	<LoQ

Fonte: Autor

Foi possível observar que todas as amostras de leite estavam dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA, JETRO e ATSDR. Contudo, de acordo com o valor nutricional, o leite com baixos teores de Cu^{2+} também não é ideal, uma vez que a hipocupremia acarreta em problema de saúde como a osteoporose, Alzheimer, manchas na pele e outros.²⁸

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, um RAIP-BSA foi sintetizado e caracterizado para a extração de Cu^{2+} em amostras de leite. Por meio da caracterização física, FT-IR e TG, foi possível observar que o revestimento com a BSA foi eficiente e que essa modificação não altera significativamente a estrutura química do material. Segundo dados da literatura⁵⁹, o RAIP exclui cerca de 85% das macromoléculas, enquanto que o RAIP-BSA exclui 98% e por isso, esse material foi escolhido para realizar as análises. A substituição da digestão ácida pela coluna de SPE com o RAIP-BSA, vai de encontro à tendência da Química Verde, uma vez que quantidades de ácido significativamente menores foram utilizadas no preparo de amostra.

O ensaio de cinética de adsorção mostrou que o equilíbrio de adsorção é alcançado em 10 min e que o modelo não linear que a explica é o modelo de pseudo-primeira ordem, caracterizando um processo de fisissorção, ou seja, um processo físico, sendo provavelmente uma atração eletrostática entre íons de Cu^{2+} e RAIP-BSA. A isoterma de adsorção, por sua vez, foi melhor ajustada ao modelo de Sips, sendo essa uma combinação entre as isotermas de Langmuir e Freundlich.

O método foi otimizado de forma univariada para diluição, volume da amostra e tipo de eluente e de modo multivariado por meio do planejamento fatorial completo 2^3 e matriz de Doehlert para as variáveis pH, vazão de pré-concentração e concentração do eluente, o que ajudou a determinar as melhores condições de análise, a fim de se obter a melhor resposta analítica.

Por meio dos testes de seletividade, foi possível concluir que o RAIP-BSA apresenta seletividade melhorada ao íon de interesse – Cu^{2+} - uma vez que, na presença de interferentes, os sinais analíticos obtidos com o RANIP-BSA sofreram maiores alterações quando comparados àqueles obtidos pelo RAIP-BSA.

Boas figuras de mérito foram alcançadas, com baixo LoD e LoQ, ampla faixa linear, boa precisão e exatidão. Outras características como boa seletividade, vida útil da coluna RAIP-BSA elevada, facilidade de operação, dentre outras, devem ser destacadas.

O método foi utilizado para a determinação em amostras de leite comercializadas em Alfenas e região, no qual todas as amostras analisadas estavam de acordo com o que preconiza as legislações internacionais e nacionais.¹⁰

Por fim, vale ressaltar que o presente sistema pode ser utilizado para analisar Cu^{2+} em outros tipos de amostras complexas, como bebidas e alimentos. Além disso, é um

método capaz de determinar concentrações diminutas de elementos traços com exatidão e precisão.

REFERÊNCIAS

- [1] COMUNICAÇÕES, Globo. **Criação de boi fatura R\$ 76 bilhões por ano no Brasil.** Agronegócio. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/agro-a-industria-riqueza-do-brasil/noticia/2019/01/18/criacao-de-boi-fatura-r-76-bilhoes-por-ano-no-brasil.ghtml> Acesso em 10 set.2019.
- [2] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho bovino tem leve alta em 2019, após dois anos seguidos de quedas.** 2020. Disponível em: <https://censo2021.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/29164-rebanho-bovino-tem-leve-alta-em-2019-apos-dois-anos-seguidos-de-quedas.html#:~:text=A%20leve%20alta%20de%200,exportador%20desse%20tipo%20de%20carne>. Acesso em: 15 abr.2021.
- [3] ZOCCAL, Rosângela. **Os dez maiores produtores de leite do mundo.** Compre Rural. Campo Grande, 2019. Disponível em: <https://www.comprerural.com/confira-os-10-maiores-produtores-de-leite-do-mundo/> Acesso em 10 set. 2019.
- [4] MALISZEWSKI, Eliza. **Dia Mundial do Leite: os desafios da cadeia.** Agrolink, 2020. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/dia-mundial-do-leite--os-desafios-da-cadeia_434701.html#:~:text=O%20Brasil%20ocupa%20a%2065%C2%AA,Gerais%2C%20o%20maior%20produtor%20nacional. Acesso em 25 nov. 2020.
- [5] GONZÁLEZ, Félix H.D; DURR, João Walter; FONTANELI, Roberto S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.5-77, 2001.
- [6] SARGENTELLI, Vagner; MAURO, Antônio Eduardo; MASSABNI, Antônio Carlos. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova.** Araraquara-SP, v.19, n. 290, 1995.
- [7] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.** Resolução RDC nº 269, 2005.
- [8] RODRIGUES, Mônica Aparecida; SILVA, Priscila Pereira; GUERRA, Wendell. Cobre. **Química Nova Na Escola.** Uberlândia, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012.
- [9] FAQUIM, Elaine de Souza. **Estudo da determinação do cobre por análise por diluição isotópica subestequiométrica.** 1994. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.). Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo.

- [10] SUQUILA, Fabio Antônio Cajamarca; TARLEY, César Ricardo Teixeira. Performance of restricted access copper-imprinted poly (allylthiourea) in an on-line preconcentration and sample clean-up FIA-FAAS system for copper determination in milk samples. **Talanta**, Londrina, v. 202, p. 460–468, 2019.
- [11] SILVESTRE, M. D. *et al.* Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. **Food Chemistry**, Espanha, v. 68, n.1, p. 95–99, 1999.
- [12] MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos**. 1998. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/anexo/anexo_prt0685_27_08_1998.pdf Acesso em: 15 mar. 2020.
- [13] SKOOG, HOLLER, NIEMAN. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Editora Bookman, São Paulo-SP, 2002.
- [14] FERREIRA, Edilene; SOUZA, Gilberto; NOGUEIRA, Ana Rita. FIA-FAAS method for tannin determination based on a precipitation reaction with hemoglobin. **J. Braz. Chem. Soc.** São Carlos, v.14, n.2, 2003.
- [15] KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B., “Introduction to Microwave Sample Preparation. Theory and Practice”, ACS, Professional Reference Book, Washington, 1998.
- [16] DE FARIA, H. D. *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, Alfenas, v. 959, p. 43–65, 2017.
- [17] SADILEK, Petr; SATINSKY, Dalibor; SOLICH, Petr. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, República Tcheca, v.26, n.5, p. 375–384, 2007.
- [18] SANTOS, Mariane Gonçalves; FIGUEIREDO, Eduardo Costa. Preparo de amostras empregando polímeros de impressão molecular. *In*: Borges, K.B.; Figueiredo, E.C.; Queiroz, M.E.C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 88-96.
- [19] GAMA, Mariana Roberto; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation, **J. Chromatogr.** Campinas, v.1043, p.107–121, 2015.
- [20] CAI, X. *et al.* Novel Pb²⁺ Ion imprinted polymers based on ionic interaction via synergy of dual functional monomers for selective solid-phase extraction of Pb²⁺ in water samples, **ACS Appl. Mater. Interfaces**, China, v.6, p. 305–313, 2014.
- [21] MARESTONI, L. D. *et al.* Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v.36, n.8, p.1194–1207, 2013.

- [22] DE OLIVEIRA, L. L. G. *et al.* Synthesis and application of restricted access material-ion imprinted poly (allylthiourea) for selective separation of Cd²⁺ and humic acid exclusion. **Reactive and Functional Polymers**, Londrina, v.134, p. 93-103, 2019.
- [23] LEE John D. **Química inorgânica não tão concisa**. Tradução da 5^a ed. inglesa. Editora Edgard Blücher Ltda. pp. 24, [S.I], v.217, p. 360-370, 1999.
- [24] AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC no 269, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-269-de-22-de-setembro-de-2005.pdf/view>. Acesso em: 06 dez. 2020.
- [25] MAGALHÃES, Lana. **Cobre**. 2019. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/cobre/>. Acesso em: 02 fev. 2021.
- [26] AZEVEDO, Sebastião Márcio. *et al.* Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.3, p.618-624, 2003.
- [27] LIMA, Verônica Ferreira; MERÇON, Fábio. Metais pesados no ensino de química. **Quim. Nova na Escola**. Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, 2011.
- [28] JOHNSON, Larry. **Doença de Wilson**. 2020. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/dist%C3%BArbios-nutricionais/minerais/doen%C3%A7a-de-wilson>. Acesso em: 02 fev. 2021.
- [29] DAUGHERTY, K.E.; ROBINSON, R. J.; MUELLER, J.I. X-ray fluorescence spectrometric determination of the copper(II) and mercury(II) complexes of 6-chloro, 2-methoxy-9- thiolacridine, **Anal. Chem.** Washington, v.36, p.1098-1100, 1964.
- [30] POURNAGHI-AZHAR, M.H.; DASTANGO, H. Extraction and polarography of copper (II) - bis(acetylaceton) ethylenediamine in dichloromethane: use of differential pulse method for the determination of copper in steel, **Microchem. J.** Irã, v.64, p.187-194, 2000.
- [31] AMLANI, A.M.; TUREL, Z.R. Substoichiometric determination of copper by neutron activation analysis, **J. Radioanal. And Nuclear Chem.** Índia, v.144, p.27-33, 1999.
- [32] WALSH, Alan. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochimica Acta**, Austrália, v.7, p.108–117, 1955.
- [33] L'VOV, B. V. Electrothermal atomization—the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Leningrado, v.33, n.5, p.153–193, 1978.

- [34] KRUG, F.J *et al.* Espectrometria de Absorção Atômica: **Fundamentos e atomização com chama**. Juiz de Fora, 2004. Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1-revisada.pdf> Acesso em: 15 mar. 2020.
- [35] MIRANDA, C. E. S. *et al.* Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA - CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.412–419, 2002.
- [36] ROCHA, Fábio Rodrigo Piovezani; MARTELLI, Patrícia Benedini; REIS, Boaventura Freire. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.1, 2000.
- [37] REIS, Boaventura Freire. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, Piracicaba, v.19, n.1, 1996.
- [38] RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. **Analytica Chimica Acta**, LyngbyDenmark, v. 78, n.1, 1975.
- [39] KRUG, F. J.; BERGAMIN F°, H.; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Piracicaba, v.179, p. 103–118, 1986.
- [40] MURAKI, H. *et al.* Fully automated system for the continuous monitoring of ammonium ion in fish farming plant sea water by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Tóquio, v.261, n.1-2, p.345–349, 1992.
- [41] ZAGATTO, E. A. G. *et al.* An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. **Analytica Chimica Acta**, Piracicaba, v.120, p.399–403, 1980.
- [42] MUSTRA, Carla de Jesus Grilo Oliveira. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metaloides em amostras biológicas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses), Lisboa.
- [43] COSTA, Rui Cerdeira de Campos. **Aplicação da análise por injeção sequencial à automatização de metodologias analíticas em espectrofotometria de absorção atômica**. Dissertação (Doutorado em Farmácia) Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal, p. 47, 2000.
- [44] Dos Reis, Boaventura Freire. Pré-concentração empregando extração fase líquida-fase sólida em sistemas de análise em fluxo com detecção espectrométrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 623-635, 1996.
- [45] ZHAOLUN, F. *et al.* On-line separation and preconcentration in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, China, v.214, p.41–55, 1998.
- [46] VILHENA, M. “Digestores de Amostras por Micro-ondas”, COPASA - MG, [S.I.], p.3-5, 1996.

- [47] KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B., "Introduction to Microwave Sample Preparation. Theory and Practice", ACS, **Professional Reference Book**, Washington, 1998.
- [48] CYPRIANO, João Carlos. **Determinação simultânea de cobre e chumbo em amostras de azeite de dendê (*Elaeis guineensis*) por técnicas de redissolução utilizando o método de extração assistida por ultrassom**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química), Juiz de Fora,
- [49] XU, H. *et al.* Simultaneous Preconcentration of Cobalt, Nickel and Copper in Water Samples by Cloud Point Extraction Method and their Determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry, **Procedia Environmental Sciences**, China, v.18, p.258-263, 2013.
- [50] DURUKAN, İlknur; ŞAHİN, Çiğdem Arpa; BEKTAŞ, Sema. Determination of copper traces in water samples by flow injection-flame atomic absorption spectrometry using a novel solidified floating organic drop microextraction method, **Microchemical Journal**, Turquia, v.98, p.215-219, 2011.
- [51] TOBIASZ, Anna; WALAS, Stanisław. Solid-phase-extraction procedures for atomic spectrometry determination of copper, **Trends in Analytical Chemistry**, Polônia, v.62, p.106-122, 2014.
- [52] SHRIVAS, Kamlesh; JAISWAL, Nitin Kumar. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of copper in cereals and vegetable food samples using flame atomic absorption spectrometry, **Food Chemistry**, Índia, v.141, p.2263-2268, 2013.
- [53] CHAMJANGALI, M. A. *et al.* Synthesis and application of chloromethylated polystyrene modified with 1-phenyl-1,2-propanedione-2-oxime thiosemicarbazone (PPDOT) as a new sorbent for the on-line preconcentration and determination of copper in water, soil, and food samples by FAAS. **Journal of Hazardous Materials**, Irã, v.192, n.3, p.1641-1649, 2011.
- [54] GHAEDI, M. *et al.* Flame atomic absorption spectrometric (FAAS) determination of copper, iron and zinc in food samples after solid-phase extraction on Schiff base-modified duolite XAD 761. **Materials Science and Engineering**, Irã, v.33, n.4, p.2338-2344, 2013.
- [55] AL-SAIDI, H. M. Biosorption using chitosan thiourea polymer as an extraction and preconcentration technique for copper prior to its determination in environmental and food samples by flame atomic absorption spectrometry: Synthesis, characterization and analytical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Arábia Saudita, v.93, p.390-401, 2016.
- [56] XIANG, G. *et al.* Determination of trace copper in food samples by flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on modified soybean hull. **Journal of Hazardous Materials**, China, v.179, n.1-3, p. 21-525, 2010.

- [57] PIRES, Ana Luiza.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, São Paulo, v.38, n.7, p.957-971, 2015.
- [58] DIAS, A. C. B. *et al.* Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, São Paulo, v.76, n.5, p.988–996, 2008.
- [59] SELLERGRÉN, Borje. Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. **Trends in Analytical Chemistry**, Alemanha, v.16, n.6, p.310–320, 1997.
- [60] FIGUEIREDO, Eduardo Costa.; DIAS, Ana Cristi Basile.; ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Alfenas, v.44, n.3, 2008.
- [61] HART, Bradley.; RUSH, Daniel.; SHEA, Kenneth. Discrimination between Enantiomers of Structurally Related Molecules: Separation of Benzodiazepines by Molecularly Imprinted Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, Califórnia, v.122, n.3, p.460–465, 2000.
- [62] BELTRAN, A. *et al.* Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Espanha, v.29, n.11, p.1363–1375, 2010.
- [63] HAGINAKA, Jun. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. **Journal of Chromatography B**, Japão, v.866, n.1-2, p. 3–13, 2008.
- [64] NISHIDE, Hiroyuki.; DEGUCHI, Jichio.; TSUCHIDA, Eishun. Selective adsorption of metal ions on crosslinked poly (vinylpyridine) resin prepared with a metal ion as a template. **Chemistry Letters**, Japão, v.5, n.2, p.169–174, 1976.
- [65] BRANGER, Catherine; MEOUCHE, Walid; MARGAILLAN, André. Recent advances on ion-imprinted polymers. **Reactive and Functional Polymers**, França, v.3, n.6, p.859–875, 2013.
- [66] MAFU, Lihle; MSAGATI, Titus; MAMBA, Bhekie. Ion-imprinted polymers for environmental monitoring of inorganic pollutants: synthesis, characterization, and applications. **Environmental Science and Pollution Research**, África do Sul, v.20, n.2, p.790–802, 2012.
- [67] GUO, M. *et al.* Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains, **Biomaterials**, China, v.27, p.4381-4387, 2006.
- [68] RACHKOV, Alexandre; MINOURA, Norihiko. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. **The epitope approach, Biochim. Biophys. Acta**, Ucrânia, v.1544, p.255-266, 2001.
- [69] TARLEY, César Ricardo Teixeira; SOTOMAYOR, Maria Del Pilar Taboada; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1:

preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Quim. Nova**, São Paulo, v.28, p.1076-1086, 2005.

- [70] SANTOS, Mariane Gonçalves. **Síntese, caracterização e emprego de Polímeros Molecularmente Impressos na extração de fármacos em amostras humanas de plasma e urina**. 2015. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, p. 23-28.
- [71] HOGENDOORN, Elbert.; ZONEN, Piet Van. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis, **J. Chromatogr. A**, Holanda, v.892, p.435-453, 2000.
- [72] DANIEL, Sobhi.; RAO, P Prabhakara; RAO, T Prasada. Investigation of different polymerization methods on the analytical performance of palladium (II) Environ Sci Pollut Res (2013) 20:790–802 799 ion imprinted polymer materials. **Anal Chim Acta**, Índia, v.536, p.197–206, 2005.
- [73] YOSHIDA, M. *et al.* Metalimprinted microsphere prepared by surface template polymerization and its application to chromatography. **J Polym Sci A**, Japão, v.38, p.689–696, 1999.
- [74] LI, T. *et al.* Preparation of an ionimprinted fiber for the selective removal of Cu 2p. **Langmuir**, China, v.27, p.6753–6758, 2011.
- [75] HE, C. *et al.* Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **J. Biochem. Biophys. Methods**, China, v.70, p.133-150, 2007.
- [76] CHEN, Lingxin.; XU, Shoufang.; LI, Jinhua. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. **Chem Soc Rev**, China, v.40, p.2922–2942, 2011.
- [77] KRYSCIO, David R.; PEPPAS, Nicholas A. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. **Acta Biomater**, Estados Unidos, v.8, n.2, p.461– 473, 2012.
- [78] Liu X. *et al.* Uniformsized molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl by one-step swelling and polymerization method. **Talanta**, China, v.71, p.1205–1210, 2007.
- [79] RUDOLPHI, A. BOOS, K.S. The use of restricted-access media in HPLC, Part I e classification and review, **LC-GC**, [S.l], v..15, n.9, p.602-611. 1997.
- [80] HUANG, W. *et al.* Preparation and application of a restricted access material with hybrid poly (glycerol mono-methacrylate) and cross-linked bovine serum albumin as hydrophilic out layers for directly on-line high performance liquid chromatography analysis of enrofloxacin and gatifloxacin in milk samples. **Journal of Chromatography A**, China, v.1573, p.59-65, 2018.
- [81] ABRÃO, C. *et al.* Restricted Access Materials for Sample Preparation. **Handbook of Smart Materials in Analytical Chemistry**. [S.l], p.411-438, 2019.

- [82] JÚNIOR, Aluizio Gonçalves Brasil. **Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-VI**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- [83] CASSIANO, N. M. *et al.* Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.** São Carlos, v.384, p.1462-1469, 2006.
- [84] GOMES, Raphael A B. *et al.* Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **J Mater Sci**, Alfenas, v.51, p.7407–7414, 2016.
- [85] BOOS, Karl Siegfried; FLEISCHER, Claudia. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). **J. Anal. Chem.** Alemanha, v.371, p. 16-20, 2001.
- [86] SUQUILA, Fábio; De OLIVEIRA, Leandro; TARLEY, César. Restricted access copper imprinted poly(allylthiourea): The role of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the sorptive performance of imprinted polymer. **Chemical Engineering Journal**, Londrina, v.350, p.714–728, 2018.
- [87] OLIVEIRA, L. *et al.* Synthesis and application of restricted access material-ion imprinted poly(allylthiourea) for selective separation of Cd²⁺ and humic acid exclusion, **React. Funct. Polym.** Londrina, v.134, p.93–103, 2019.
- [88] De OLIVEIRA, L. *et al.* Restricted access material-ion imprinted polymer-based method for on-line flow preconcentration of Cd²⁺ prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **Microchemical Journal**, Londrina, v.157, 2020.
- [89] HAGINAKA, J. *et al.* Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, Japão, v.849, n.2, p.331–339, 1999.
- [90] PUOCI, F. *et al.* New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, Itália, vol.45, n.6, p.1634–1640, 2009.
- [91] SANTOS, Mariane Gonçalves. *et al.* Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. **The Analyst**, Alfenas, v.140, n.22, p.7768–7775, 2015.
- [92] SILVA, Katriny Kyona Muniz Sirgom. **Emprego de polímeros de impressão molecular de acesso restrito para a extração direta de antidepressivos em**

- plasma humano seguido de análise por HPLC.**2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG.
- [93] FERREIRA, Marcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015, 493 p.
- [94] FERREIRA, M. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, 1999.
- [95] MA, L. *et al.* Optimization of acidified oil esterification catalyzed by sulfonated cation exchange resin using response surface methodology. **Energy Convers. Manag.** China, v.98, p.46–53, 2015.
- [96] COIMBRA J. *et al.* Técnicas multivariadas aplicadas ao estudo da fauna do solo: contrastes multivariados e análise canônica discriminante. **Revista Ceres**, Viçosa, v.54, p.270-276, 2007.
- [97] DALLASTRA A. *et al.* Multivariate approach in the selection of superior soybean progeny which carry the RR gene. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.45, p.588-597, 2014.
- [98] ELLISON, Stephen; BARWICK, Vicki; FARRANT, Trevor. **Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide.** Cambridge, 2009, 263 p.
- [99] NUNES, Lidiane Cristina. **Estratégias quimiométricas para análise de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser.** 2011. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP.
- [100] FERREIRA, S.L.C. *et al.* Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry, review. **Talanta**, Recife, v.63, n.4, p.1061–1067, 2004.
- [101] NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas – SP: Editora da Unicamp, 2001, 412 p.
- [102] De OLIVEIRA, I. *et al.* A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alfenas, v.405, n.24, p.7687–7696, 2013.
- [103] BEZERRA, Marcos de Almeida. **Aplicação da matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para a determinação de cobre usando espectrometria de absorção atômica com chama.** Dissertação (Mestrado em Ciências). 2003. Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA.
- [104] RUSCHEL, C.F.C. *et al.* Otimização do processo de transesterificação em duas etapas para produção de biodiesel através do planejamento experimental Doehlert. **Quím. Nova.** Porto Alegre, v.39, n.3, p.267-272, 2016.

- [105] SILVEIRA, Gustavo.; TARLEY, César Ricardo Teixeira. Determinação turbidimétrica do antidepressivo amitriptilina em sistema fia explorando a formação do par iônico com lauril sulfato de sódio. **Quim. Nova**, Alfenas, v.31, n.7, p.1653-1659, 2008.
- [106] NOVAES, Cléber Galvão. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA.
- [107] MORAES, G. O. I. *et al.* A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Anal. Bioanal. Chem.** Alfenas, v.405, p.7687–7696, 2013.
- [108] COMARCK, Peter A.; ELORZA, Amaia Zurutuza. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **J. Chromatogr. A**, Reino Unido, v.804, p.173-182, 2004.
- [109] IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. – Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica, **Cerâmica**, São Paulo, v.26, p.17 –24, 1980.
- [110] LIMA, Giovana de Fátima. **Avaliação de matriz de sílica modificada com óxidos mistos dispersos como sorvente na pré-concentração e especiação de íons metálicos usando sistema FIA-FAAS**. 2012. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG.
- [111] BRITO, N. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.129-146, 2003.
- [112] ALLEONI, L. *et al.* Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. **Sci. agric.** Piracicaba, v.55, n.3, 1998.
- [113] TAVERNIERS, Isabel; LOOSE, Marc; BOCKSTAELE, Erik Van. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **Trends in Analytical Chemistry**, Bélgica, v.23, n.7, p.480–490, 2004.
- [114] POOLE, Colin; GUNATILLEKA, Ajith; SETHURAMAN, Revathy. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, **Journal of Chromatography A**, Estados Unidos, v.885, p.17-39, 2000.
- [115] ZAMBERLIN, S. *et al.* Mineral elements in milk and dairy products, **Mljekarstvo**, Croácia, v.62, p.111–125, 2012.
- [116] GORDON, I. Chapter 9: Minerals and vitamins in milk and dairy products, in: A. Kanekanian (Ed.), **Milk and Dairy Products as Functional Foods**, John Wiley e Sons Ltd., **Oxford**, Suíça, v.9, p.289–313, 2014.

- [117] RADHIKA, M.; PALANIVELU, K., Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost Adsorbent-Kinetics and isotherm analysis. **Journal of Hazard**, Índia, v.138, n.1, 2006.
- [118] FERNANDES, Raquel Maria Trindade. **Polímero de impressão molecular para a extração seletiva de fármacos em matrizes biológicas e determinação por LC-MS/MS e MS/MS**. 2012. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Campinas. Campinas – SP.
- [119] TOLEDO, Ismael Laurindo Costa Junior. **Cinética de bioacumulação do íon Pb^{+2} na macrófita aquática pistia stratiotes**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, Toledo.
- [120] MIMURA, A.M.S.; VIEIRA, T.V.A.; MARTELLI, P.B.; GORGULHO, H. F. Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.6, p.1279–1284, 2010.
- [121] FOO K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, Malásia, v.156, n.1, p.2–10, 2010.
- [122] BRASIL, R.B. *et al.* Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.25, n.2, p.71-80, 2015.
- [123] ANALYTICAL, Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of limit detection. **Analist**. Estados Unidos, v.112, 1987.
- [124] SWARTZ, M. Method Validation. **Chromatography**. Milford, 2007.