



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FABIO ANTONIO CAJAMARCA SUQUILA

**SÍNTESE E EMPREGO DE IIP-RAM PARA PRÉ-  
CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO *ON-LINE* DE ÍONS  
Cu<sup>2+</sup> COM SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE PROTEÍNA EM  
AMOSTRAS DE LEITE UTILIZANDO FIA-F AAS**

FABIO ANTONIO CAJAMARCA SUQUILA

**SÍNTESE E EMPREGO DE IIP-RAM PARA PRÉ-  
CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO *ON-LINE* DE ÍONS  
Cu<sup>2+</sup> COM SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE PROTEÍNA EM  
AMOSTRAS DE LEITE UTILIZANDO FIA-F AAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira  
Tarley

Londrina  
2019

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

SU959 Suquila, Fábio Antonio Cajamarca.

Síntese e emprego de iip-ram para pré-concentração e determinação on-line de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com simultânea exclusão de proteína em amostras de leite utilizando FIA-F AAS / Suquila Fabio Antonio Cajamarca . - Londrina, 2019. 202 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019. Inclui bibliografia.

1. Cobre - Tese. 2. Co-monômero hidrofílico - Tese. 3. Albumina do soro bovino - Tese. 4. Espectrometria de absorção atômica com chama - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

FABIO ANTONIO CAJAMARCA SUQUILA

**SÍNTESE E EMPREGO DE IIP-RAM PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E  
DETERMINAÇÃO *ON-LINE* DE ÍONS  $\text{Cu}^{2+}$  COM SIMULTÂNEA  
EXCLUSÃO DE PROTEÍNA EM AMOSTRAS DE LEITE UTILIZANDO  
FIA-F AAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Dimas A. Morozin Zaia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

---

Prof. Dr. Vitor de Cinque Almedia  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 08 de março de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradezco a Dios, por iluminarme día a día en los diferentes caminos que he recorrido en mi vida, ayudándome a superar las dificultades y necesidades que tuve que afrontar durante este proceso a nivel personal y profesional, especialmente por estar lejos de mi familia, amigos y seres queridos. Además, por todas las bendiciones y momentos de felicidad otorgados.

A mi orientador Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley, por todo el apoyo durante la realización de los experimentos, por las sugerencias y correcciones hechas en la discusión de los resultados, así como en la escrita de los diferentes artículos y documentos presentados en los congresos y eventos, lo cual contribuyo significativamente para mi crecimiento profesional. Además, por la oportunidad brindada al hacerme participe de proyectos paralelos, enriqueciendo especialmente mi currículo y formación académica. También por la amistad, comprensión y consejos en algunas situaciones a nivel personal.

A mis padres y a mi tía Adela, quienes con sus actos de amor, esfuerzos y palabras de motivación me dieron apoyo incondicional día a día durante todos estos 4 años lejos de casa. Espero que Dios me dé la oportunidad para retribuir todo ese amor y todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos (Esperanza, Rosalba, Saul, Paola, Gloria, Andrés Prias), sobrinos (Sandy, Daniel, Camila, Natalia, Camilo, Nicolas, Santiago y Andrés), ahijadas (Ana María, Isa y Laura), cuñados (Chalito, Eduardo, Alirio y Patricia), amigos de corazón (Andrés L, Diana Pin, Sandra, María Guarín, Mafe y Lili), Madrina Rosa, tíos, primos y demás seres queridos, que con cada mensaje, audio o video llamada me demostraron que la amistad y el cariño no tiene límites.

A Juliana Casarín, Marcela Corazza y Fernanda Midori por su gran e invaluable apoyo profesional, quienes, desde su respectiva experiencia y conocimiento, facilitaron mi adaptación y desempeño en el laboratorio y en el grupo de investigación.

A mis amigos: Juliana, Andrés, Leandro, Luana, Eduardo, Keilla, Alexandra, Dalva, Jhessica, Tainara, Midori, Guilherme, Maiyara, Fernanda García, Gabriel, Fábio, Lucineia, Laura, Catalina, Janeth, Freddy, Leonardo, Daniel, Lucas y José, a quienes conocí aquí en Londrina, y sin importar el orden en el que aparecen, se transformaron en mi familia brasileña, celebrando y compartiendo momentos

únicos de felicidad, así como diferentes experiencias y enseñanzas de vida.

A la Universidad Estadual de Londrina (UEL) por la oportunidad de ingresar al doctorado.

A los laboratorios y técnicos involucrados en la realización de algunos análisis.

A los profesores que orientaron las disciplinas del doctorado, contribuyendo a mi formación química y como profesor.

Y finalmente, a mis compañeros del grupo de investigación y todas las personas que no fueron mencionadas, pero que de alguna forma contribuyeron con la realización de este proyecto.

*¡De corazón, muchas gracias a todos!*

*Todos nuestros sueños se pueden hacen realidad,  
si tenemos el coraje de perseguirlos.*

*-Walt Disney*

CAJAMARCA SUQUILA, Fabio Antonio. **Síntese e emprego de IIP-RAM para pré-concentração e determinação *on-line* de Íons Cu<sup>2+</sup> com simultânea exclusão de proteína em amostras de leite utilizando FIA-F AAS.** 2019. 202 fls. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

No presente estudo, polímeros impressos para Cu<sup>2+</sup>, baseados em poli(aliltiourea), foram sintetizados em acetonitrila (ACN) [Cu<sup>2+</sup>-IIP<sub>(ACN)</sub>] ou etanol (EtOH) [Cu<sup>2+</sup>-IIP (EtOH)] e modificados com 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e albumina de soro bovino (BSA) para avaliar a influência do solvente porogênico e a presença dos modificadores de superfície (acesso restrito) nas propriedades morfológicas, térmicas, texturais e hidrofílicas dos polímeros. Também foi avaliado o desempenho dos polímeros frente à pré-concentração e determinação *on-line* de íons Cu<sup>2+</sup> com simultânea exclusão de proteína em sistema FIA-F AAS. A caracterização dos polímeros foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de Raios X (EDS), análise termogravimétrica (TGA), fisissorção de gás nitrogênio, efeito *swelling*, molhabilidade e ponto de carga zero (PCZ). Constatou-se que os polímeros sintetizados em ACN apresentaram maior porosidade e características hidrofílicas em comparação com os polímeros sintetizados em EtOH e, como consequência, maior capacidade de retenção de íons Cu<sup>2+</sup>. Com base nos coeficientes de seletividade relativa (k'), o IIP<sub>(ACN)</sub> mostrou maior seletividade (k' > 1) em relação ao polímero não impresso [NIP<sub>(ACN)</sub>] na presença de íons metálicos potencialmente competitivos com a mesma carga e raio iônico similar, confirmando assim o efeito da impressão química criada durante a síntese do polímero IIP<sub>(ACN)</sub>. Verificou-se também que a presença do co-monômero hidrofílico (HEMA) e da proteína BSA na superfície do IIP<sub>(ACN)</sub> diminuiu acentuadamente a seletividade do polímero. Contudo, dentre os polímeros sintetizados, o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> foi o único polímero que apresentou capacidade para reter íons Cu<sup>2+</sup> e excluir simultaneamente a proteína BSA em meio aquoso. Assim, o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> foi utilizado para o desenvolvimento de método analítico, em que, um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com ponto central em triplicata foi empregado para determinar as condições otimizadas da massa do polímero - MP (50,0 mg), vazão de pré-concentração - VP (7,6 mL min<sup>-1</sup>) e concentração do eluente - CE (1,0 mol L<sup>-1</sup>) para a pré-concentração de íons Cu<sup>2+</sup>, fixando o pH em 4,50. A capacidade máxima de adsorção (q<sub>sat</sub>) do polímero em condições dinâmicas e a pré-concentração/determinação de íons Cu<sup>2+</sup> foram avaliadas na ausência e presença de BSA (0,5 e 1,5 g L<sup>-1</sup>) em meio aquoso, bem como na presença de íons comumente encontrados em amostras de leite. O método analítico forneceu uma curva analítica variando de 3,6 a 100,0 µg L<sup>-1</sup>, fator de pré-concentração de 24 vezes, limite de detecção e quantificação de 1,1 e 3,6 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente, eficiência de pré-concentração de 9,1 min<sup>-1</sup>, índice de consumo de 0,83 mL e frequência analítica de 20 h<sup>-1</sup>. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade intra-dia (n = 10) e inter-dia (n = 2), enquanto a exatidão foi avaliada por meio do teste de adição/recuperação de solução padrão de Cu<sup>2+</sup> em amostras de leite e também pela digestão ácida das amostras com determinação por GF AAS, como técnica de referência. A concentração de Cu encontrada em leite bovino foi 0,635 ± 0,042 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, enquanto para leite de soja entre 0,048 ± 0,008 e 0,094 ± 0,005 mg kg<sup>-1</sup> de Cu. De acordo com nosso conhecimento, o potencial do IIP-HEMA-BSA para extração de íons Cu<sup>2+</sup> a partir de amostras de leite, removendo o efeito de matriz e empregando um mínimo de pré-tratamento da amostra foi demonstrado pela primeira vez. Desta forma, o método proposto pode ser considerado simples, rápido e de baixo custo quando comparado com o método de digestão ácida assistida por micro-ondas.

**Palavras-chave:** Cobre. Aliltiourea. Co-monômero hidrofílico. Albumina do soro bovino. Análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com chama.

CAJAMARCA SUQUILA, Fabio Antonio. **Synthesis and employ of IIP-RAM for on-line preconcentration and determination of Cu<sup>2+</sup> ions with simultaneous protein exclusion in milk samples using FIA-F AAS.** 2019. 202 pp. Thesis (PhD in Chemistry) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

In the present study, imprinted polymers towards Cu<sup>2+</sup> based on poly(allylthiourea) were synthesized in acetonitrile (ACN) (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(ACN)</sub> or ethanol (EtOH) (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(EtOH)</sub> and modified with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) to evaluate the influence of porogenic solvent and the presence of surface modifiers (restrict access) on morphological, thermal, textural and hydrophilic properties of the polymers, and their performance on the on-line preconcentration/determination of Cu<sup>2+</sup> ions with simultaneous exclusion of protein in FIA-F AAS system. Characterization of polymers was carried out by means of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), thermogravimetric analysis (TGA), nitrogen physisorption (textural data), swelling analysis, wettability measurement and determination of point zero charge (PZC). It was noticed that the polymers synthesized in ACN showed higher porosity and hydrophilic characteristics than the one synthesized in EtOH, and as a consequence, higher Cu<sup>2+</sup> ions retention capacity. Based on the relative selectivity coefficients ( $k'$ ), the IIP<sub>(ACN)</sub> showed higher selectivity ( $k' > 1$ ) than the non-printed polymer [NIP<sub>(ACN)</sub>] over a range of foreign metal ions with same charge and similar ionic radius, thus confirming the imprinting effect created during polymer synthesis. It was also found that the hydrophilic co-monomer (HEMA), as well as the larger molecule BSA coating on IIP<sub>(ACN)</sub> decreases accentually the selectivity of sorbent. Nevertheless, among the polymers synthesized, the IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> was the only polymer that demonstrated great capability in promoting simultaneously the sorption of Cu<sup>2+</sup> ions and exclusion of BSA protein in aqueous solution. Thus, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> was used for the development of the analytical method, where a full factorial design 2<sup>3</sup> with a central point in triplicate and pH fixed at 4.50 was employed to find the optimized conditions of the polymer mass - PM (50.0 mg), preconcentration flow rate - PFR (7,6 mL min<sup>-1</sup>) and eluent concentration - EC (1.0 mol L<sup>-1</sup>) for the Cu<sup>2+</sup> ions preconcentration. The maximum sorbent capacity (q<sub>sat</sub>) of the polymer under dynamic conditions and the Cu<sup>2+</sup> ions preconcentration were assessed in the presence and absence of BSA (0.5 and 1.5 g L<sup>-1</sup>) in an aqueous medium, as well as in the presence of ions commonly found in milk samples. The method analytical features provided an analytical curve ranging from 3.6 to 100.0 µg L<sup>-1</sup>, preconcentration factor of 24-fold, limit of detection and quantification of 1.1 and 3.6 µg L<sup>-1</sup>, preconcentration efficiency of 9.1 min<sup>-1</sup>, consumption index of 0.83 mL and sample throughput of 20 h<sup>-1</sup>. The precision of the method was evaluated in terms of intra-day (n = 10) and inter-day (n = 2) repeatability, whereas, the accuracy was attested by Cu<sup>2+</sup> ions addition/recovery analysis and by analysis with GF AAS in previously microwave-digested bovine and soy milk samples. The proposed method was successfully applied to the copper determination in milk samples, requiring only pH adjustment followed by the preconcentration step as sample pretreatment. Copper content in bovine milk samples was 0.635 ± 0.042 mg kg<sup>-1</sup> while to soy milk samples was between 0.048 ± 0.008 and 0.094 ± 0.005 mg kg<sup>-1</sup>. To the best of our knowledge, IIP-HEMA-BSA potential for Cu<sup>2+</sup> ions extraction from milk samples, removing matrix effect and employing minimal sample pretreatment was for the first time demonstrated. The proposed extraction method stands out by being simple, fast and a low-cost analytical strategy when compared to the conventional microwave-assisted acid digestion.

**Keywords:** Copper. Allylthiourea. Hydrophilic co-monomer. Bovine serum albumin. Flow injection analysis coupled to flame atomic absorption spectrometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do processo de síntese de um polímero ionicamente impresso (IIP).....	34
<b>Figura 2</b>	Classificação de: a) cátions e moléculas em ácidos duros, moles e intermediários; e b) ligantes em bases duras, moles e intermediárias, segundo Pearson (1988) .....	37
<b>Figura 3</b>	Principais monômeros funcionais classificados em (a) ácidos, (b) básicos e (n) neutros.....	38
<b>Figura 4</b>	Outros monômeros funcionais utilizados na síntese de IIP.....	39
<b>Figura 5</b>	Representações esquemáticas de alguns IIP reportados na literatura contendo ligantes não vinilados.....	40
<b>Figura 6</b>	Estrutura química dos agentes de ligação cruzada empregados na síntese de IIP.....	45
<b>Figura 7</b>	Estrutura química dos iniciadores radicalares utilizados na síntese de IIP, bem como a representação da reação de iniciação a partir do 2,2'-azo-isobutironitrila (AIBN).....	50
<b>Figura 8</b>	Número de trabalhos publicados por ano sobre IIP entre 1991 e 2019.....	51
<b>Figura 9</b>	Mecanismo da etapa de iniciação em poliadição via radical livre.....	56
<b>Figura 10</b>	Mecanismo da etapa de propagação em poliadição iniciado via radical livre.....	57
<b>Figura 11</b>	Mecanismos da etapa de terminação em poliadição iniciado via radical livre.....	58
<b>Figura 12</b>	Mecanismo para polimerização em superfície por Iniferter.....	59
<b>Figura 13</b>	Representação esquemática de um material polimérico com acesso restrito (RAM).....	62
<b>Figura 14</b>	Representação esquemática das fases ISRP e ADS.....	63
<b>Figura 15</b>	Número de trabalhos publicados por ano sobre RAM entre 1987 e 2019.....	65
<b>Figura 16</b>	Representação esquemática do processo da síntese e estrutura dos polímeros (Cu <sup>2+</sup> )-IIP <sub>(ACN)</sub> , (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub> e (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub> .....	77

<b>Figura 17</b>	Representação geral dos componentes do equipamento Quantachrome® Nova 1200e: a) desgaseificador e b) analisador.....	80
<b>Figura 18</b>	Representação do esquema montado para determinar o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos polímeros compactados na forma de pastilhas (discos), depositando 1,3 µL de água na superfície desses materiais.....	83
<b>Figura 19</b>	Esquema de classificação de materiais sólidos em hidrofóbicos ou hidrofílicos com base na magnitude do ângulo de contato entre a gota de água e a superfície plana do sólido.....	83
<b>Figura 20</b>	Sistema de pré-concentração e eluição em fluxo de Cu <sup>2+</sup> : a) etapa de pré-concentração, posição da minicoluna na linha 1; b) etapa de eluição, posição da minicoluna na linha 2....	85
<b>Figura 21</b>	Curva de ruptura ( <i>breakthrough</i> ) típica.....	89
<b>Figura 22</b>	Modelo de Thomas aplicado a uma curva de ruptura.....	92
<b>Figura 23</b>	Reação de adição nucleofílica sobre o carbonilo eletrofílico do glutaraldeído e redução da imina para amina na imobilização de BSA sobre o polímero (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA <sub>(ACN,EtOH)</sub> .....	101
<b>Figura 24</b>	Espectro FT-IR da ATU pura e dos polímeros (Cu <sup>2+</sup> )-IIP, (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA, (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA e NIP-HEMA-BSA sintetizados em: a) acetonitrila (ACN); e b) etanol (EtOH).....	102
<b>Figura 25</b>	Curvas termogravimétricas TG e derivada DTG dos polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN): (a) na presença de Cu <sup>2+</sup> ; e (b) Cu <sup>2+</sup> removido da matriz polimérica.....	105
<b>Figura 26</b>	Curvas termogravimétricas TG e derivada DTG dos polímeros sintetizados em etanol (EtOH): (a) na presença de Cu <sup>2+</sup> ; e (b) Cu <sup>2+</sup> removido da matriz polimérica.....	107
<b>Figura 27</b>	Imagens de microscopia eletrônica de varredura nas ampliações 70, 2000, 10.000 e 30.000 vezes com escala de 1,0 mm, 50 µm, 10 µm e 2,0 µm, respectivamente, do polímero (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA sintetizado em acetonitrila (ACN) e etanol (EtOH).....	108
<b>Figura 28</b>	Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos polímeros (Cu <sup>2+</sup> )-IIP, (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA, (Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA sintetizados em ACN e EtOH, e NIP-HEMA-BSA(ACN), com ampliação de 30.000 vezes e escala de 2,0 µm. ....	108

<b>Figura 29</b>	(a) Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio e (b) distribuição de tamanho de poros estimada pelo método BJH para os polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN).....	111
<b>Figura 30</b>	(a) Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio e (b) distribuição de tamanho de poros estimada pelo método BJH para os polímeros sintetizados em etanol (EtOH).....	112
<b>Figura 31</b>	Imagens de MEV, mapeamento dos átomos de enxofre (S) e cobre (Cu), e espectro de energia dispersiva (EDS) dos polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN) e etanol (EtOH)....	114
<b>Figura 32</b>	Fotografias (plano transversal) da gota de água estática sobre a superfície dos polímeros compactados na forma de disco. Interfaces: polímero-água (p-w), polímero-vapor (p-v) e água-vapor (w-v).....	116
<b>Figura 33</b>	Determinação do $pH_{PCZ}$ dos polímeros em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl ( $pH_i$ : valor de pH inicial; $pH_f$ : valor de pH final). Cada ponto de pH corresponde à média $n=3 \pm DP$ .....	119
<b>Figura 34</b>	Mudanças conformacionais da estrutura da BSA em função do pH.....	120
<b>Figura 35</b>	Efeito do pH sobre o sinal analítico (absorbância) dos íons $\text{Cu}^{2+}$ usando os polímeros $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ e $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ em sistema de pré-concentração por análise por injeção em fluxo.....	121
<b>Figura 36</b>	Especiação teórica do Cu na forma de hidroxocomplexos em água pura. ( $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{Cu}^{2+}$ é equivalente a $1,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Cu}^{2+}$ ).....	122
<b>Figura 37</b>	a) Formas tautoméricas da ATU, e b) Diversas formas de coordenação entre a ATU e o metal de transição.....	123
<b>Figura 38</b>	Esquema de diagrama de níveis de energia do orbital molecular com distorção tetragonal (alongamento axial) para o complexo $\text{Cu}^{2+}$ -ATU.....	125
<b>Figura 39</b>	Efeito do pH sobre o sinal de absorbância de $\text{Cu}^{2+}$ na ausência e presença de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de BSA em pH 4,75, 7,45 e 9,40, com tampão, utilizando os polímeros $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ e $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ em sistema de pré-concentração por análise de injeção em fluxo.....	126

<b>Figura 40</b>	Efeito do pH sobre o sinal de absorvância de $\text{Cu}^{2+}$ na ausência e presença de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de BSA em pH 4,75, 7,45 e 9,40, sem tampão, utilizando os polímeros $\text{IIP}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ e $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ em sistema de pré-concentração por análise de injeção em fluxo.....	127
<b>Figura 41</b>	Representação esquemática do íon $\text{Cu}^{2+}$ formando uma ponte entre o polímero e proteína BSA, e a mesma molécula de BSA ligada com outros íons $\text{Cu}^{2+}$ mediante ligações fracas de dissulfeto.....	128
<b>Figura 42</b>	Espectros de absorção na região ultravioleta (240-330 nm) da solução de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ BSA na ausência e presença de $\text{Cu}$ ( $100,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ em pH 4,75 sem tampão) e dos efluentes obtidos na etapa de pré-concentração utilizando os polímeros $\text{IIP}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ e $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ .....	129
<b>Figura 43</b>	Exclusão da proteína BSA (%) utilizando os polímeros $\text{IIP}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ , $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ e $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ em pH 4,75 na ausência de tampão.....	130
<b>Figura 44</b>	Sinal de absorvância de $\text{Cu}^{2+}$ na ausência e presença de BSA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) em pH 4,00, 4,50, 4,75 e 5,00 sem tampão utilizando $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ em sistema FIA.....	131
<b>Figura 45</b>	Diagrama de Pareto dos efeitos principais [(1) MP= Massa do Polímero, (2) VP= Vazão de Pré-concentração, (3) CE=concentração do HCl como eluente], e suas interações (MPxVP, MPxCE, VPxCE) quando analisados (a) pela absorvância – altura do pico e (b) pela eficiência de sensibilidade.....	136
<b>Figura 46</b>	Modelo não linear de Thomas aplicado às curvas de rupturas obtidas pela percolação de soluções contendo: A) $\text{Cu}^{2+}$ , B) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e C) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ), através da minicoluna contendo $50,0 \text{ mg}$ do polímero $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ com vazão constante de $7,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Cu}^{2+}$ , pH 4,50 na ausência de tampão. $V_{\text{Rup}}$ : volume de ruptura, $V_{\text{Sat}}$ : volume de saturação.....	138
<b>Figura 47</b>	Curvas analíticas obtidas com a pré-concentração de (●) $\text{Cu}^{2+}$ na ausência de BSA, (●) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e (●) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ), em sistema FIA-F AAS sob condições otimizadas ( $50,0 \text{ mg}$ do polímero $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ , vazão de pré-concentração de $7,6 \text{ mL min}^{-1}$ , pH: 4,50 sem tampão e eluente HCl $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ )..... Curvas analíticas obtidas com a inserção do LQ teórico e	142

<b>Figura 48</b>	a etapa de pré-concentração de: (■) $\text{Cu}^{2+}$ na ausência de BSA, (■) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) e (■) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) em sistema FIA-F AAS sob condições otimizadas (50,0 mg do polímero IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub> , vazão de pré-concentração de 7,6 mL min <sup>-1</sup> , pH 4,50 sem tampão e eluente HCl 1,00 mol L <sup>-1</sup> ). LQ: limite de quantificação. Faixa de concentração de $\text{Cu}^{2+}$ : LQ-100 µg L <sup>-1</sup> .....	143
<b>Figura 49</b>	Curvas analíticas obtidas sem a etapa de pré-concentração (aspiração direta no F AAS) de: a) (▲) $\text{Cu}^{2+}$ na ausência de BSA, (▲) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) e (▲) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) na faixa de concentração de 100,0 - 6000,0 µg L <sup>-1</sup> de $\text{Cu}^{2+}$ ; b) Inserção do LQ (Limite de Quantificação) nas curvas: (◆) $\text{Cu}^{2+}$ na ausência de BSA, (◆) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) e (◆) $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ).....	144
<b>Figura 50</b>	Efeito dos íons interferentes na porcentagem de recuperação do sinal analítico de $\text{Cu}^{2+}$ na ausência e presença e de BSA 0,5 g L <sup>-1</sup> .....	149
<b>Figura 51</b>	Esquema resumido do processo de formação de átomos metálicos no nebulizador e na chama.....	150
<b>Figura 52</b>	Efeito da aspiração direta do leite nas seguintes diluições: 50,0:50,0 (leite:água, % v/v) e 25,0:75,0 (leite:água, % v/v) na descontinuidade da chama pelo acúmulo de leite na cabeça do queimador.....	153
<b>Figura 53</b>	Amostras de leite bovino e soja após ajuste de pH em 4,50 e centrifugadas.....	154
<b>Figura 54</b>	Determinação de íons $\text{Cu}^{2+}$ em amostra de leite bovino M2-Bov-Int, após a precipitação de proteína em pH 4,50 com HCl e utilizando os polímeros IIP <sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub> .....	155

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poros dos polímeros sintetizados.....	109
<b>Tabela 2</b>	Determinação da % em mmol da ATU, EGDMA e HEMA nos polímeros IIP <sub>(ACN)</sub> , NIP <sub>(ACN)</sub> , IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub> a partir da análise elementar CHNS.....	115
<b>Tabela 3</b>	Caráter hidrofílico dos polímeros expressado como porcentagem de teor de água em equilíbrio (%TAE) em pH 6,80.....	117
<b>Tabela 4</b>	Valores do coeficiente de distribuição ( $K_d$ ), coeficiente de seletividade ( $k$ ) e coeficiente de seletividade relativo ( $k'$ ) dos polímeros impressos e os polímeros controle não-impressos.....	133
<b>Tabela 5</b>	Fatores, níveis descodificados e respostas analíticas (absorbância e eficiência de sensibilidade) obtidas pela matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ com ponto central em triplicata.....	135
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros obtidos a partir das curvas de ruptura e do modelo de Thomas na sorção de $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L <sup>-1</sup> ) e $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L <sup>-1</sup> ) em condições dinâmicas.....	140
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros analíticos para $\text{Cu}^{2+}$ com e sem etapa de pré-concentração, na presença e ausência de 0,5 e 1,5 g L <sup>-1</sup> de BSA, com adição do LQ.....	146
<b>Tabela 8</b>	Concentração de $\text{Cu}^{2+}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) encontrada em diferentes marcas de leite bovino empregando o método de digestão ácida assistida por micro-ondas e o IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS.....	156
<b>Tabela 9</b>	Concentração de $\text{Cu}^{2+}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) encontrada em amostras de leite bovino e leite de soja empregando o método proposto sem digestão ácida e o IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS.....	157
<b>Tabela 10</b>	Teste t pareado aplicado às concentrações de $\text{Cu}^{2+}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) encontradas nas amostras de leite bovino e soja pelo método de digestão assistida por micro-ondas e pelo método proposto em sistema FIA-F AAS.....	158
<b>Tabela 11</b>	Teste t pareado aplicado às concentrações de $\text{Cu}^{2+}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) encontradas nas amostras de leite bovino e soja pelo sistema FIA-F AAS e GF AAS.....	159

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Função biológica das principais metaloproteínas de Cu e as consequências no organismo pela deficiência de Cu.....	23
<b>Quadro 2</b>	Solventes porogênicos comumente empregados na síntese de IIP.....	43
<b>Quadro 3</b>	Polímeros impressos encontrados na literatura que foram sintetizados para à adsorção de íons metálicos em amostras com matriz complexa.....	47
<b>Quadro 4</b>	Estratégias de síntese de IIP e micrografias MEV para observar a possível morfologia das partículas poliméricas após a síntese.....	52
<b>Quadro 5</b>	Classificação dos IIP segundo a natureza química de seus componentes.....	60
<b>Quadro 6</b>	Descrição geral dos polímeros sintetizados neste estudo.....	78
<b>Quadro 7</b>	Concentrações dos íons encontrados comumente em amostras de leite bovino.....	94
<b>Quadro 8</b>	Valor nutricional (1 copo = 200,0 mL) e valor de pH de diferentes tipos de leite bovino (integral e desnatado) e leite de soja.....	96
<b>Quadro 9</b>	Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no método proposto com outros métodos analíticos usando SPE para pré-concentração de íons $\text{Cu}^{2+}$ com determinação pela técnica F AAS.....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-VID	Monômero 1-vinilimidazol
4-VP	Monômero 4-vinilpiridina
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ADS	Fase alquil-diol-sílica
AIBN	2,2'-azobis-iso-butironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Adição de Padrão Interno
AR	Acidez Residual
ATU	Alitiourea
ATSDR	Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
BJH	Método de Barrett-Joyner-Halenda
BSA	Albumina de Soro Bovino
C <sub>18</sub>	Coluna cromatográfica Octadecil
CCR	Conteúdo de Carbono Residual
CE	Concentração do Eluente
CFA-C	Mistura de aminas ternárias solúveis em água
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil
CPE	Extração por Ponto Nuvem (do inglês, <i>Cloud Point Extraction</i> )
CPTP	Condições Padrão de Temperatura e Pressão
Da	Unidade de massa atômica ou Daltón
Des	Leite Desnatado
D <sub>MP</sub>	Diâmetro médio dos poros
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTG	Curva termogravimétrica derivada
DVB	Divinilbenzeno
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
EGDMA	Dimetacrilato de Etilenoglicol
EP	Eficiência de Pré-concentração
Eq.	Equação
EtOH	Etanol

ES	Eficiência de Sensibilidade
FA	Frequência Analítica
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> )
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FIA-F AAS	Análise de Injeção em Fluxo acoplado a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
FPC	Fator de Pré-concentração
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GDMA	Glicerol Dimetacrilato
GF AAS	Espectrofotometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (do inglês, <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> )
GFF	Tripeptídeo Glicina-L-Fenilalanina-L-Fenilalanina
GMA	Glicidil Metacrilato
GMMA	Glicerol Monometacrilato
GPTMS	(3-glicidoxi)propiltrimetoxisilano
HEMA	2-Hidroxietil Metacrilato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	Albumina de Soro Humano
IC	Índice de Consumo
ICP-MS	Espectrometria de Massas com fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IIP	Polímero Ionicamente Impresso (do inglês, <i>Ion Imprinted Polymer</i> )
IIP-RAM	Polímero Ionicamente Impresso contendo Acesso Restrito (do inglês, <i>Ion Imprinted Polymer – Restricted Access Media or Material</i> )
Int	Leite Integral
ISRP	Superfície Interna de Fase Reversa
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

JECFA	Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares
JETRO	Organização do Comércio Externo do Japão
k	Coeficiente de seletividade
k'	Coeficiente de seletividade relativa
$k_{Th}$	Constante do modelo de Thomas
K	Kelvin (Unidade de Temperatura)
$K_d$	Coeficiente de distribuição
Kps	Constante de produto de solubilidade
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAA	Ácido Metacrílico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Monômero Funcional
MFP	Fases de Múltiplas Funções
MIP	Polímeros Molecularmente Impressos (do inglês, <i>Molecularly Imprinted Polymers</i> )
MIP-RAM	Polímero Molecularmente Impresso contendo Acesso Restrito (do inglês, <i>Molecularly Imprinted Polymer – Restricted Access Media or Material</i> )
MM	Molécula Molde
MMA	Metacrilato de Metila
MP	Massa do Polímero
MQ	Média Quadrática
MX	Marca do leite, onde X representa a marca.
$N_{AV}$	Constante de Avogadro (número de moléculas por mol)
NIP	Polímero Não Impresso (do inglês, <i>Non-imprinted Polymer</i> )
NIP-RAM	Polímero Não Impresso contendo Acesso Restrito
n	número de repetições experimentais.
PCZ	Ponto de Carga Zero
pH	Potencial de Hidrogeniônico.
PIE	Ponto Isoelétrico
$q_{sat}$	Capacidade máxima de adsorção determinada no ponto de saturação experimentalmente

$q_{Th}$	Capacidade máxima de adsorção determinada pelo modelo Thomas
RACNT	Nanotubos de carbono com Acesso Restrito
RAM	Meios ou Materiais de Acesso Restrito
RDRP	Polimerização Radicalar com Desativação Reversível
REQM	Raiz do Erro Quadrático Médio.
$S_{BET}$	Área superficial específica determinada pelo método Brunauer-Emmett-Teller.
SPE	Extração em Fase Sólida
SPS	Fase com Superfície Semi-Permeável
SQE	Soma Quadrada dos Erros
TAE	Teor de Água de Equilíbrio
TCD	Detector de condutividade térmica
TEOS	Tetraetoxissilano
TG	Curva termogravimétrica
TGA	Análise Termogravimétrica
TMHA	Hidróxido de tetrametilamônio
TRIM	Trimetacrilato de 2,2-bis (hidroximetil) butanol
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VP	Vazão de Pré-concentração
$V_{Rup}$	Volume de Ruptura
$V_{Sat}$	Volume de Saturação
$V_{TP}$	Volume total de poros
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i> )
Zlac	Leite Zero Lactose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>32</b>
2.1	POLÍMEROS IONICAMENTE IMPRESSOS (IIP) .....	32
2.1.1	História .....	32
2.1.2	Síntese .....	34
2.1.3	Componentes do IIP.....	35
2.1.3.1	Íon metálico.....	35
2.1.3.2	Ligante .....	36
2.1.3.3	Solvente porogênico.....	42
2.1.3.4	Agente de ligação cruzada.....	44
2.1.3.5	Iniciador radicalar .....	46
2.1.4	Características Gerais dos IIP .....	51
2.1.5	Estratégias para Síntese de IIP .....	52
2.1.6	Reações de Polimerização.....	55
2.1.7	Classificação dos IIP .....	60
2.2	MEIOS OU MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM) .....	61
2.3	POLÍMEROS IONICAMENTE IMPRESSOS COM ACESSO RESTRITO (IIP-RAM)....	66
2.4	DETERMINAÇÃO DE METAIS NO LEITE .....	67
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>73</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	73
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>74</b>
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	74
4.2	SÍNTESE DO IIP E IIP-RAM .....	75
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS E INSTRUMENTAÇÃO .....	78
4.3.1	Espectroscopia FT-IR.....	78
4.3.2	Análise Térmica.....	79
4.3.3	Parâmetros Texturais por Fisissorção de Gás N <sub>2</sub> .....	79
4.3.4	Características Morfológicas e Composição Elementar Semiquantitativa .....	82

4.3.5	Análise Elementar CHNS .....	82
4.3.6	Determinação da Molhabilidade dos Polímeros .....	82
4.3.7	Efeito <i>Swelling</i> .....	84
4.3.8	Ponto de Carga Zero (PCZ) .....	84
4.4	SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu <sup>2+</sup> .....	84
4.5	EFEITO DO PH NA ADSORÇÃO DE ÍONS Cu <sup>2+</sup> .....	86
4.6	ESTUDO DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNA .....	86
4.7	ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	87
4.8	OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Cu <sup>2+</sup> EM SISTEMA FIA-F AAS POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA .....	88
4.9	CURVA DE RUPTURA .....	89
4.10	PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Cu <sup>2+</sup> EM FIA-F AAS .....	92
4.11	ESTUDO DE ÍONS INTERFERENTES.....	93
4.12	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS .....	95
4.12.1	Determinação de Íons Cu <sup>2+</sup> por Aspiração Direta da Amostra no F AAS..	98
4.12.2	Preparo das Amostras por Digestão Ácida Assistida por Micro-ondas .....	98
4.12.3	Preparo das Amostras pelo Método Proposto.....	99
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>100</b>
5.1	SÍNTESE DOS POLÍMEROS.....	100
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS .....	101
5.2.1	Espectroscopia FT-IR.....	101
5.2.2	Análise Térmica.....	104
5.2.3	Imagens MEV e Fisissorção de Gás N <sub>2</sub> .....	107
5.2.4	Mapeamento e Distribuição Elementar .....	113
5.2.5	Análise Elementar CHNS .....	113
5.2.6	Hidrofilicidade/Hidrofobicidade .....	115
5.2.7	Ponto de Carga Zero (PCZ) .....	118
5.3	EFEITO DO PH .....	120
5.4	ESTUDO DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNA .....	125
5.5	ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	132
5.6	OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Cu <sup>2+</sup> EM SISTEMA FIA-F AAS POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA .....	134

5.7	CURVA DE RUPTURA .....	138
5.8	PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO PROPOSTO.....	141
5.9	ESTUDO DE ÍONS INTERFERENTES.....	149
5.10	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE LEITE.....	151
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>162</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>163</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>183</b>
	ANEXO A – Espectro FT-IR da ATU e dos polímeros sintetizados em ACN.....	184
	ANEXO B – Espectro FT-IR da ATU e dos polímeros sintetizados em EtOH.....	185
	ANEXO C – Curva TG e derivada DTG da ATU pura .....	186
	ANEXO D – Curva TG e derivada DTG da proteína BSA em pó .....	187
	ANEXO E – Artigo Científico: Caracterização dos polímeros .....	188

## 1. INTRODUÇÃO

Os metais traços são elementos não-biodegradáveis e não sintetizados pelo homem, cuja concentração no solo, água subterrânea, plantas, entre outros é  $\leq 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g kg}^{-1}$  [1,2].

O cobre (Cu), como elemento essencial, é requerido em baixas concentrações (micronutriente) para a realização de algumas funções vitais nos seres vivos, principalmente no metabolismo de carboidratos e lipídios [3]. Este metal encontra-se amplamente distribuído nos tecidos e ligado com as proteínas mediante o grupo tiolato (R-SH) ou tioéter (R-S-R) formando as metaloproteínas. Assim, dependendo da natureza da ligação Cu-S e da disposição geométrica nos locais ativos, podem-se formar numerosas metaloproteínas com um ou mais átomos de Cu no local ativo, desempenhando funções biológicas específicas [4,5]. No Quadro 1 são apresentadas as principais metaloproteínas de Cu com sua respectiva função biológica e as consequências no organismo pela deficiência deste elemento.

**Quadro 1.** Função biológica das principais metaloproteínas de Cu e as consequências no organismo pela deficiência de Cu.

<b>Metaloproteínas de Cu</b>	<b>Função biológica</b>	<b>Consequências no organismo pela deficiência do Cu</b>
Superóxido dismutase (SOD)	Impede a ação dos radicais livres sobre a oxidação de lipídeos (estresse oxidante).	Produz uma maior oxidação dos lipídios e as células oxidadas aumentam o risco de contrair câncer e doenças cardíacas.
Citocromo oxidase	Transporta elétrons durante a respiração aeróbica para reduzir o $\text{O}_2$ em duas moléculas de água.	Transtornos no metabolismo oxidativo.
Lisil oxidase	Responsável pela ligação cruzada de colágeno e elastina, que são essenciais para a formação de tecido conjuntivo forte e flexível.	Fraturas ósseas, anormalidades do esqueleto e osteoporose.
Tirosinase (polifenoloxidase)	Enzima responsável pela síntese do pigmento melanina, para proteção contra o excesso de exposição ao ultravioleta e para a cor do cabelo, pele e olhos.	Formação de manchas de pele, melasmas.

Ceruloplasmina	Essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina; Atua como armazenadora e transportadora de Cu para manter a homeostase desse elemento.	Anemia.
----------------	---	---------

**Fonte:** adaptada das referências [6,7]

Estima-se que o corpo humano adulto contém de 50,0 a 120,0 mg de Cu, distribuídos no esqueleto e medula óssea (46,0 mg), nos músculos esqueléticos (26,0 mg), no fígado (10,0 mg), no cérebro (8,8 mg) e no sangue (6,0 mg), nos eritrócitos (0,9 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e no plasma (0,8 a 1,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) [6,8]. No entanto, como o corpo humano não pode produzir Cu, deve obtê-lo a partir de alimentos ou suplementos dietéticos, entre eles o leite bovino, chocolate, fígado animal, crustáceos, moluscos, legumes verdes, frutos secos e nozes, sendo mais biodisponível em carnes do que vegetais [9].

Desta forma, o Cu pode estar presente nos alimentos de forma natural ou como resultado da contaminação proveniente da água e/ou solo utilizados nos processos de produção e processamento, assim como das embalagens de armazenamento [10]. O Cu pode estar exposto no meio ambiente por fontes naturais (atividade vulcânica) e antropogênicas (mineralização, descarga de resíduos industriais, combustão de combustíveis fósseis, fertilizantes fosfatados, entre outros) e pode ser absorvido pelos vegetais e animais, provocando a biomagnificação e intoxicação ao longo da cadeia alimentar [11]. Entretanto, em níveis excessivos no corpo humano, o Cu tende a se bioacumular em diferentes órgãos (fígado, cérebro e outros órgãos vitais) causando efeitos adversos na saúde, como a doença de Wilson, a cirrose da infância indiana ou a toxicose idiopática do Cu [12].

Com base no exposto, legislações nacionais e internacionais estabeleceram valores de ingestão diária recomendada (IDR) com intuito de proteger a saúde humana, uma vez que a cadeia alimentar é a fonte primária de exposição ao Cu nos seres humanos. Além disso, foram preconizados níveis máximos de concentração de Cu em alimentos, bem como na água e no solo usados nos diferentes processos inerentes para a produção e processamento dos mesmos. Entre esses alimentos, encontra-se o leite bovino e seus derivados (produtos láteos) por serem amplamente

consumidos por lactantes e crianças devido a que são produtos de alto valor nutricional (minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais e ácidos graxos) na dieta humana.

O Codex Alimentarius JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) administrado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) [13] estabeleceu que a ingestão diária recomendada (IDR) de Cu deve ser de 0,5 - 0,7 mg kg<sup>-1</sup> p.c./dia (peso corporal por dia) para lactentes (até 6 meses de idade) e 2,0 - 3,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c./dia para adultos, enquanto, o regulamento da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adotou os valores de IDR de 200,0 - 220,0, 340,0 - 440,0 e 900,0 µg por dia de Cu para lactentes, crianças e adultos, respectivamente [14].

Com relação aos níveis máximos de concentração de Cu em alimentos, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria 685 de 1998 do Ministério de Saúde (Secretaria de Vigilância Sanitária), estabeleceu 2,0 mg kg<sup>-1</sup> para alimentos que contem lactose [15], enquanto, 0,3 e 0,6 mg kg<sup>-1</sup> foram estabelecidos pela Agência de Registro de Substâncias e Doenças Tóxicas (ATSDR) e pela Organização de Comércio Exterior do Japão (JETRO), respectivamente [12,16].

Da mesma forma, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) [17] e a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) [18] estabeleceram 1,3 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, como o nível máximo de concentração de Cu para água potável, usada na produção de alimentos. O Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil (CONAMA) adotou 9,0 e 13,0 µg L<sup>-1</sup> como valores máximos permitidos para o Cu dissolvido em água doce do tipo 1 e 3, respectivamente [19], 1,0 mg L<sup>-1</sup> para efluentes de qualquer fonte poluidora e 200,0 mg kg<sup>-1</sup> para solos destinados à produção agrícola [20,21]. Assim, torna-se cada vez mais necessário realizar o monitoramento contínuo deste metal em amostras de alimentos, especificamente no leite bovino e produtos láteos.

Atualmente, diversas técnicas analíticas são empregadas para a detecção e quantificação de Cu em amostras de leite bovino. Dentre elas, a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [22-24], a espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [25], a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) [26,27], a

espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) [11] e a espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS) [28].

Embora o ICP OES, ICP-MS, GF AAS e TS-FF-AAS sejam altamente sensíveis e seletivas para a determinação direta do Cu em amostras de leite bovino, essas técnicas sofisticadas possuem altos custos de aquisição e manutenção e, em geral, não estão disponíveis em muitos laboratórios de pesquisa. Assim, a técnica F AAS torna-se mais atrativa para este propósito. No entanto, a determinação direta de Cu em amostras de leite bovino pelo F AAS é limitada, não apenas pela baixa concentração do Cu ( $\leq \mu\text{g L}^{-1}$ ), mas também devido ao forte efeito de matriz.

Desse modo, as amostras de leite bovino devem ser submetidas a procedimentos de pré-tratamento baseados em digestão ácida assistida por micro-ondas, com evaporação do ácido, seguido de etapas de pré-concentração para viabilizar a análise e conferir aumento na detectabilidade do F AAS, fornecendo baixos limites de detecção. Os métodos de pré-concentração mais utilizados na determinação de Cu por F AAS em leite bovino são a extração por ponto nuvem (CPE) [29] e extração em fase sólida (SPE) [11,30-32]. No entanto, a SPE é a mais popular devido às suas vantagens, incluindo a simples operação, baixo consumo de solvente, fácil combinação com diferentes técnicas de detecção, além da ampla gama de materiais que podem ser usados como adsorventes. Além disso, pode ser facilmente acoplada à análise por injeção em fluxo (FIA) para pré-concentração *on-line*, o que permite a fácil regeneração e reutilização da fase sólida, baixo volume de amostra, facilidade de automação e maior frequência analítica [33]. Cabe salientar que parâmetros como seletividade, capacidade de adsorção e fator de pré-concentração dependem fortemente das propriedades do material adsorvente [34]. Outro ponto importante, é que o adsorvente deve ser quimicamente estável para a sua regeneração e reutilização após a etapa de eluição.

Adsorventes como nanopartículas de polidopamina com estrutura core-shell de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [11], resinas AG-1 X-8 e Chelex-100 [22], resina Amberlite XAD-4 modificada com 1,8-diaminonaftaleno [26], casca de soja modificada [30], *Aspergillus niger* imobilizadas sobre nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  [32] e sílica gel imobilizada com *o*-vanilina [35], têm sido empregados na SPE para pré-concentração de Cu em amostras de leite bovino. Porém, esses adsorventes são usados após a digestão ácida do leite bovino devido à reduzida capacidade que apresentam para excluir macromoléculas. Caso contrário, a análise torna-se inviável uma vez que a presença de macromoléculas

(proteínas) no leite bovino pode diminuir drasticamente a retenção do Cu. Por outro lado, os adsorventes mencionados possuem baixa seletividade e, conseqüentemente, podem reter outros íons metálicos presentes no leite bovino e interferir no sinal analítico durante a atomização após a etapa de eluição.

Perante o exposto, com o intuito de melhorar a capacidade do adsorvente para extrair/pré-concentrar seletivamente o Cu e/ou excluir macromoléculas, novos materiais adsorventes foram desenvolvidos [36], destacando-se: os polímeros ionicamente impressos (IIP, do inglês *Ion Imprinted Polymer*), por apresentar alta afinidade e reconhecimento seletivo de íons [37], e os meios ou materiais de acesso restrito (RAM, do inglês *Restricted Access Media or Material*), devido a sua capacidade para reter analitos de baixo peso molecular e excluir macromoléculas [38].

Os IIP são polímeros sintéticos, propostos por Nishide e colaboradores em 1976 [39], baseados na técnica de impressão molecular, que por sua vez, é fundamentada na teoria de formação de anticorpos desenvolvida por Pauling (interação biomolecular) [40,41]. Os primeiros polímeros impressos foram sintetizados por Wulff-Sarhan e Takagishi-Klotz em 1972 [42,43], com reconhecimento seletivo para moléculas e foram denominados MIP, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*. Os MIPs são polímeros que possuem uma estrutura tridimensional rígida, e que podem atuar de forma análoga à cadeia polipeptídica de um anticorpo com propriedades seletivas [44], sendo amplamente empregados nas técnicas de separação (cromatografia, eletrocromatografia capilar, extração em fase sólida), ensaios de ligação e sensores [37,45].

A elevada seletividade dos polímeros impressos é resultado da criação de locais de ligação feitos sob medida com memória de tamanho e forma, que por sua vez são formados por meio da interação entre os monômeros funcionais e o *template* (molécula ou íon) na presença de reagentes reticulantes [40,41,44].

Embora a tecnologia de impressão molecular tenha sido bem conhecida no entendimento do conceito complementar para o reconhecimento biológico baseado no mecanismo *lock-and-key*, o que tem sido confirmado em várias publicações [46,47], sabe-se que estes materiais apresentam algumas desvantagens quando aplicados na extração de amostras com matrizes complexas como fluidos biológicos e alimentos [48]. Estas desvantagens levam a uma diminuição significativa no desempenho seletivo dos polímeros impressos devido à adsorção de macromoléculas (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, etc.) em suas superfícies, obstruindo assim

os locais de ligação feitos sob medida e, como consequência, causando perda indesejada na capacidade de adsorção e seletividade. Por esse motivo, a maioria dos estudos que aplicam IIP para a pré-concentração de íons metálicos em amostras complexas relatam a necessidade de procedimentos prévios de digestão ácida para fazer uma análise confiável livre de interferências [49,50].

Nesse contexto, Hagestam e Pinkerton em 1905 [51] propuseram os meios ou materiais de acesso restrito (RAM), fazendo referência a materiais adsorventes poliméricos contendo em sua superfície externa uma camada hidrofílica com grupos funcionais e/ou proteínas capazes de excluir quantitativamente as macromoléculas por meio de uma barreira de difusão física, baseada no tamanho do poro, ou por uma barreira química de difusão, obtida por meio de uma camada hidrofílica, onde as moléculas de baixo peso (analitos) ficam retidas na superfície interna do RAM [38,52,53]

A barreira química pode ser obtida utilizando diferentes modificadores, tais como co-monômeros hidrofílicos ou mistura dos mesmos [glicerol monometacrilato (GMMA), glicerol dimetacrilato (GDMA) e 2-hidroxietil metacrilato (HEMA)], ou co-monômeros com anel epóxi, que após um tratamento se tornam hidrofílicos, tais como glicidil metacrilato (GMA) ou (3-glicidoxi)propiltrimetoxisilano (GPTMS) [54,55]. A inserção desses monômeros pode ser na mistura de pré-polimerização ou após um determinado tempo de polimerização. Também, pode-se obter uma camada hidrofílica immobilizando sobre a superfície do material polimérico macromoléculas hidrofílicas ou proteínas, como a albumina de soro bovino (BSA) [56].

Cabe salientar que a adsorção dos analitos nos poros dos RAM não é seletiva, portanto, estes adsorventes têm sido usualmente empregados em etapas de clean-up de fluídos biológicos e amostras de alimentos, como plasma [57], urina [58], soro [59] e leite [60].

Alguns trabalhos na literatura têm reportado com sucesso a síntese de um único material que combina a retenção seletiva dos polímeros impressos e as propriedades de exclusão de macromoléculas dos RAM, além de apresentar capacidade para evitar a interferência da água, uma vez que as moléculas de água podem diminuir significativamente a seletividade dos polímeros impressos como resultado de interações não específicas com os sítios de ligação de reconhecimento, especificamente para os MIP [61].

Este novo tipo de material foi inicialmente sintetizado para o reconhecimento de moléculas e nomeado como MIP-RAM (Do inglês, *Molecularly Imprinted Polymer with Resctricted Access Material*), pelos pioneiros Haginaka e colaboradores em 1999 [62]. Neste trabalho os autores sintetizaram um MIP-RAM contendo na superfície externa uma camada de co-monômeros hidrofílicos (GMMA, glicerol monometacrilato; e GDMA, glicerol dimetacrilato, 1:1 v/v). Este material apresentou satisfatória exclusão de albumina sérica bovina e elevado coeficiente de seletividade relativo, em que estudos preliminares revelaram que o MIP-RAM sintetizado poderia ser aplicável em soro para extrair (S)-naproxeno.

Du e colaboradores [63] sintetizaram um MIP-RAM como material para SPE de 2-metoxiestradiol em amostras de plasma com quantificação por HPLC. Os autores utilizaram como reagentes o metacrilato de metila - MMA (monômero funcional), EGDMA (agente de ligação cruzada) e o glicidil metacrilato (GMA, co-monômero). Após a polimerização foi realizada a abertura do anel epóxi do GMA com ácido perclórico 10,0%, de modo a tornar a superfície do material hidrofílica. O material obtido foi utilizado para extração e pré-concentração de 2-metoxiestradiol em plasma de rato, na qual foi observada melhor limpeza cromatográfica após a passagem da amostra por um cartucho contendo o MIP-RAM, em relação às limpezas obtidas pela passagem da amostra por cartuchos de C<sub>18</sub> e NIP-RAM (Polímero Não Impresso contendo Acesso Restrito).

Oliveira e colaboradores [55,64] sintetizaram um polímero híbrido molecularmente impresso contendo acesso restrito para a extração de ácido fólico em amostras de leite. Os pesquisadores obtiveram porcentagens de exclusão de albumina sérica bovina de 60,6% com o MIP-RAM e 44,1% com o MIP. Além disso, os coeficientes de seletividade relativos foram 1,82, 1,33, 4,37 e 1,53 na presença de cafeína, ácido úrico, 4-aminobenzamida e paracetamol, respectivamente. Da mesma forma, outros pesquisadores obtiveram MIP-RAM com elevado coeficiente de seletividade relativo e satisfatória exclusão de macromoléculas [54,56,65,66].

Em outro estudo, Santos e colaboradores [67] sintetizaram MIP-RAM para serem usados na determinação de drogas em amostras de urina usando ácido metacrílico como monômero funcional; GDMA e HEMA como co-monômeros hidrofílicos e BSA ligado à superfície do polímero. Os autores concluíram que o procedimento de síntese dos MIP-RAM influencia no tamanho e na forma das

partículas, e a adição de co-monômeros hidrofílicos, bem como o revestimento com BSA, não alteram a capacidade de reconhecimento seletivo do material.

Na literatura também pode-se encontrar a associação dos RAM com outros materiais como nanotubos de carbono ou nanopartículas magnéticas para pré-concentração de metais com exclusão de macromoléculas. Barbosa e colaboradores [68] cobriram nanotubos de carbono oxidados com camadas de albumina de soro bovino para obter nanotubos de carbono com acesso restrito (RACNT). O RACNT apresentou capacidade para extrair íons  $Pb^{2+}$  diretamente do soro de sangue humano sem empregar etapas de pré-tratamento, excluindo todas as proteínas séricas. Por outro lado, Yan e colaboradores [69] sintetizaram nanopartículas magnéticas ( $Fe_3O_4@SiO_2$ ) funcionalizadas com 4-(2-píridilazo) resorcinol (PAR) contendo acesso restrito ( $Fe_3O_4@SiO_2@PAR-MNP$ ). O material foi aplicado em amostras de urina humana e soro para a análise direta de íons metálicos livres, apresentando eficiente capacidade para excluir macromoléculas com satisfatória sensibilidade. Porém, o RACNT e o  $Fe_3O_4@SiO_2@PAR-MNP$ , mesmo apresentando elevada exclusão de proteínas e capacidade para pré-concentrar íons metálicos, são materiais não seletivos.

No que diz respeito aos IIP-RAM, o único trabalho encontrado na literatura foi reportado por Cui e colaboradores [70]. Nesse trabalho, o IIP-RAM contendo o monômero ácido metacrílico foi utilizado como adsorvente SPE em minicoluna acoplado ao ICP OES para determinação de  $Cu^{2+}$  em amostras de urina humana e soro sanguíneo. Os resultados mostram que o IIP-RAM apresentou seletividade para o íon  $Cu^{2+}$  e capacidade de exclusão de macromoléculas. No entanto, em tal estudo, nenhum co-monômero hidrofílico ou BSA foi usado como elemento modificador para reforçar a ideia de acesso restrito a materiais baseados em polímeros. Esta constatação é feita tendo em vista que estudos na literatura mostram que as abordagens mais comuns para obter polímeros impressos com acesso restrito são baseadas na modificação da superfície do polímero usando co-monômeros hidrofílicos juntos ou não com BSA ou com co-monômeros hidrofílicos obtidos após tratamento químico em conjunto ou não com BSA [61].

Com base na revisão de literatura realizada neste trabalho, a síntese e aplicação de materiais IIP-RAM ainda é incipiente e não foram encontrados estudos que descrevam a importância de modificar a superfície dos IIP para excluir macromoléculas, bem como as consequências da adição de co-monômeros

hidrofílicos e/ou proteína (como acesso restrito) sobre a capacidade seletiva dos polímeros ionicamente impressos aplicados em amostras de alimentos.

Cabe ainda salientar que além do caráter inovador da Tese no tocante ao estado da arte sobre a tecnologia de impressão química, os IIP-RAM são materiais novos que apresentam potencial para reter íons metálicos e excluir simultaneamente as macromoléculas, empregando mínimas etapas de pré-tratamento da amostra, quando comparado com as utilizadas na digestão ácida assistida por microondas. Contudo, os IIP-RAM permitem obter limites de detecção e quantificação baixos, potencializando a detectabilidade do F AAS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POLÍMEROS IONICAMENTE IMPRESSOS (IIP)

#### 2.1.1 História

Embora o enfoque deste trabalho seja os polímeros ionicamente impressos (IIP), é importante iniciar com a história dos polímeros molecularmente impressos (MIP), uma vez que com este último nasce o conceito de impressão química.

A técnica de impressão química surgiu a partir das diversas interações biomoleculares como substrato-enzima, fármaco-receptor e antígeno-anticorpo, em que, as biomacromoléculas (enzima, receptor e anticorpo) possuem sítios receptores capazes de se ligarem seletivamente a uma molécula (substrato, fármaco e antígeno) na presença de outras moléculas com estrutura análoga. No entanto, dentre os sistemas mencionados, a interação seletiva antígeno-anticorpo tem sido a mais citada para explicar o conceito de impressão química, devido ao processo de como o anticorpo artificial é formado sobre o antígeno [41,44].

Na teoria de formação de anticorpos, postulada por Linus Pauling em 1940, o antígeno (molécula molde) é inibido por um anticorpo artificial. O processo de inibição ou neutralização ocorre quando a cadeia polipeptídica do anticorpo (glicoproteína) é modelada ao redor do antígeno gerando uma configuração complementar altamente seletiva para este [40,44], em que cada anticorpo pode inibir apenas o antígeno para o qual ele foi criado. Baseado nos fundamentos da configuração complementar existente entre o antígeno-anticorpo, Frank Dickey (1949) [71] sintetizou sílica gel na presença de alaranjado de metila e de seus homólogos (etila, n-propila e n-butila) para estudar a seletividade do material adsorvente. Dickey concluiu que, ao remover o corante da sílica, há criação de sítios de ligação complementares ao respectivo corante, de modo que, quando usado esse material em processos de adsorção para os corantes citados anteriormente, a sílica apresentou maior afinidade pelo composto na qual foi sintetizada. Assim, o trabalho de Dickey foi a primeira publicação associando a sílica como material impresso molecularmente. A partir daí o desenvolvimento de materiais adsorventes com capacidade para reter seletivamente o analito tornou-se de grande interesse para diversos pesquisadores. Nesse contexto, Wulff e Sarhan (1972) [42] e Takagishi e Klotz (1972) [43] trabalharam de forma independente no preparo de polímeros impressos orgânicos, adicionando na síntese

monômeros vinílicos que continham grupos funcionais capazes de se ligar seletivamente a uma molécula. Esses polímeros foram denominados MIP (do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*). Wulff e Sarhan apresentaram a síntese de um polímero orgânico com sítios seletivos para a separação enantiomérica de racematos do ácido glicérico usando o monômero funcional (MF) éster 2,3-*o-p*-vinilfenil borônico, enquanto, Takagishi e Klotz sintetizaram um polímero com o monômero polietilenimina (PEI) na presença do corante alaranjado de metila. Tanto Wulff e Sarhan como Takagishi e Klotz confirmaram que os polímeros preparados apresentaram alta capacidade seletiva para as moléculas molde (MM). No entanto, devido à ligação covalente entre a molécula molde (MM) e o monômero funcional (MF), era difícil remover a MM do sítio de ligação, sendo necessário o emprego de hidrólise (clivagem das ligações) na maioria das situações a fim de facilitar o processo de eluição [41].

Arshady e Mosbach [72], em 1980 propuseram uma estratégia simples, chamada de “*host-guest polymerization*”, para a síntese de um polímero impresso baseado em interações não-covalentes, em que, a relação hospedeiro-hóspede (Molécula molde-Monômero funcional) era materializada durante a polimerização. Os monômeros funcionais foram escolhidos pela sua interação não-covalente (iônica, ligação de hidrogênio, hidrofóbicas, transferência de carga) com a MM, de modo que, por meio de uma lavagem simples, variando o valor de pH, força iônica, solvente, entre outros parâmetros, a remoção da MM tornou-se mais fácil e os sítios de ligação eram preservados, obtendo cavidades tridimensionais complementares à MM.

Na década de 90, Whitcombe e colaboradores (1995) [73] sintetizaram um polímero impresso para colesterol utilizando o carbonato de 4-vinilfenol como monômero funcional. Durante a síntese, a interação entre o colesterol e o monômero funcional é por ligação covalente. Não obstante, ao remover a molécula molde empregando clivagem hidrolítica com liberação de CO<sub>2</sub>, outros grupos funcionais ficam disponíveis para ligar-se novamente com o colesterol por ligações não-covalentes. Assim, foi possível sintetizar polímeros impressos molecularmente empregando estratégias baseadas em ligações de natureza covalente e não-covalente.

Em relação aos polímeros ionicamente impressos, conhecidos como IIP (do inglês, *Ion-Imprinted Polymers*), sua história começa com o trabalho de Nishide e colaboradores publicado em 1976 [39], quem prepararam os primeiros IIP orgânicos

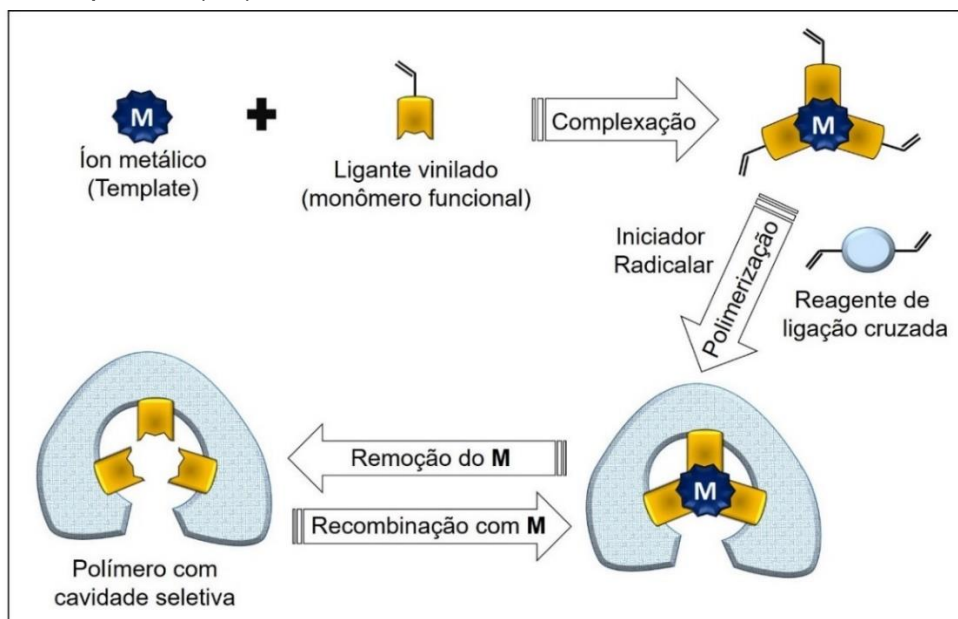
reticulando a resina quelante poli(4-vinilpiridina), previamente preparada, com 1,4-dibromobutano na presença de íons metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ). A partir dos resultados, Nishide e colaboradores mostraram que a resina apresentou maior seletividade para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  devido à estabilidade do complexo polimérico formado, e que a presença do íon metálico na síntese do polímero confere ao material polimérico elevada seletividade.

### 2.1.2 Síntese

O processo geral para a síntese de IIP pode ser resumido em três etapas segundo Saatçilar e colaboradores [74]. Inicialmente, o íon metálico (*template* ou analito) é complexado usando um ligante vinilado (monômero funcional). Em seguida, o complexo vinilado é polimerizado na presença de um agente de ligação cruzada e do iniciador radicalar, de modo que o esqueleto polimérico seja formado sobre o *template* e, conseqüentemente, permaneça incorporado na rede polimérica. Por último, após à obtenção do polímero, o íon metálico é removido com o uso de ácidos minerais diluídos, deixando espaços ou cavidades de reconhecimento tridimensional, dentro da rede polimérica, com alta afinidade pelo íon metálico [46].

Uma representação esquemática do processo geral da síntese de um IIP é ilustrada na Figura 1.

**Figura 1.** Representação esquemática do processo de síntese de um polímero ionicamente impresso (IIP).



**Fonte:** adaptada das referências [44,46]

### 2.1.3 Componentes do IIP

Como descrito na seção anterior (2.1.2), cinco substâncias químicas são usadas para a síntese de IIP. Estas são o íon metálico, ligante vinilado (monômero funcional), agente de ligação cruzada (reticulante), iniciador radicalar e solvente porogênico, cuja combinação influencia na seletividade do polímero. Desta forma, a síntese e o método de polimerização dependem da natureza química e da ligação (forças eletrostáticas, ligação covalente, ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica) entre os reagentes, bem como da relação estequiométrica entre os mesmos.

A seguir serão descritas algumas características de cada componente empregado na síntese de IIP e sua influência no processo de adsorção.

#### 2.1.3.1 Íon metálico

Geralmente, sais orgânicos ou inorgânicos são utilizados como fonte do íon metálico. Entre os sais mais comuns encontram-se o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), iodeto ( $\text{I}^-$ ), acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) e perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ). Liu e colaboradores [75] avaliaram o efeito de quatro ânions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) sobre o processo de polimerização e a capacidade de adsorção de polímeros impressos para íons  $\text{Cu}^{2+}$  [ $\text{CuSO}_4$ -IIP,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP,  $\text{CuCl}_2$ -IIP,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -IIP]. Os autores encontraram que os ânions do *template* e da solução influenciam no processo de polimerização, especificamente na formação das cavidades, bem como no processo de adsorção, respectivamente. Liu e colaboradores observaram que devido ao menor raio iônico do  $\text{Cl}^-$ , em comparação com os outros três ânions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), as cavidades impressas formadas no polímero  $\text{CuCl}_2$ -IIP não coincidem com o tamanho e forma dos ânions  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . Deste modo, menores valores de adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) foram obtidos quando foram empregadas as soluções de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  e o polímero  $\text{CuCl}_2$ -IIP. Não obstante, quando a solução de  $\text{CuCl}_2$  foi empregada, maiores valores de adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) foram obtidos com os quatro polímeros  $\text{CuSO}_4$ -IIP,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP,  $\text{CuCl}_2$ -IIP,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -IIP, o que foi atribuído ao menor tamanho do  $\text{CuCl}_2$ .

Os mesmos autores esperavam obter maior capacidade de adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando o polímero  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -IIP visto que o raio iônico do  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  é maior que do  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$ . Porém, como o  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  é um ânion orgânico, este interfere na complexação do Cu com o monômero funcional e com a formação da

cavidade. Apesar de observarem menores valores de adsorção com o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -IIP, este polímero apresentou maior seletividade que os polímeros  $\text{CuCl}_2$ -IIP >  $\text{CuSO}_4$ -IIP >  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP, na presença dos íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ . Referente aos polímeros  $\text{CuSO}_4$ -IIP,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP, foi observada maior capacidade de adsorção do polímero  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP que com o polímero  $\text{CuSO}_4$ -IIP, possivelmente devido à menor força iônica e melhor estabilidade química do anión  $\text{NO}_3^-$  durante a síntese do  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -IIP.

Fazendo uma breve revisão sobre os sais empregados na síntese de polímeros impressos para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  [76-81],  $\text{Ag}^+$  [82],  $\text{K}^+$ [83],  $\text{Li}^+$ [84],  $\text{Pb}^{2+}$  [85,86],  $\text{Zn}^{2+}$  [87,88],  $\text{Ni}^{2+}$  [89-92],  $\text{Hg}^{2+}$  [93]  $\text{Cd}^{2+}$  [94-96],  $\text{Co}^{2+}$ [97] e  $\text{U}^{5+}$  [98],  $\text{In}^{3+}$  [99] foi observado que a maioria de trabalhos utilizaram sais de nitrato. Assim, neste trabalho de tese optou-se por utilizar o sal de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  para a síntese dos polímeros.

#### 2.1.3.2 Ligante

O ligante empregado na síntese de IIP caracteriza-se por conter na estrutura o grupo vinílico ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), daí seu nome de ligante vinilado. Este ligante também é chamado de monômero bifuncional, uma vez que tem a função de formar um complexo com o íon metálico, para posteriormente incorporá-lo na rede polimérica ao participar do processo de polimerização por meio do grupo vinílico [46].

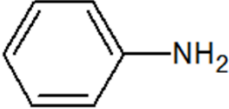
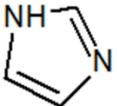
A escolha do monômero funcional depende da natureza química do íon metálico. Pearson estabeleceu na teoria HSAB (do inglês, hard and soft acid and bases) [100] que ácidos duros vão reagir preferencialmente com bases duras ou intermediárias; e ácidos moles com bases moles ou intermediárias (Figura 2), em que, o termo “duro” e “mole” está associado com a polarizabilidade dos reagentes. Assim, íons metálicos duros ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) e intermediários ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) apresentam maior interação com monômeros que possuem na sua estrutura o átomo de oxigênio (O) como doador de elétrons, enquanto, os íons metálicos moles como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  apresentam maior interação com monômeros básicos contendo o átomo de nitrogênio (N) ou enxofre (S).

**Figura 2.** Classificação de: a) cátions e moléculas em ácidos duros, moles e intermediários; e b) ligantes em bases duras, moles e intermediárias, segundo Pearson (1988).

a)

<u>Ácidos: cátions e moléculas</u>									
<u>Duros</u>					<u>Moles</u>				
H <sup>+</sup>	Sn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Th <sup>4+</sup>	I <sup>5+</sup>	Cu <sup>+</sup>	Pt <sup>2+</sup>	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>		
Li <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	As <sup>3+</sup>	Pu <sup>4+</sup>	I <sup>7+</sup>	Au <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	I <sup>+</sup>		
Na <sup>+</sup>	Se <sup>4+</sup>	Ir <sup>3+</sup>	VO <sup>2+</sup>	Cl <sup>7+</sup>	Tl <sup>+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Br <sup>+</sup>		
K <sup>+</sup>	Ga <sup>3+</sup>	Tl <sup>3+</sup>	UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	NC <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Pd <sup>2+</sup>	HO <sup>+</sup>		
Be <sup>2+</sup>	In <sup>3+</sup>	Ln <sup>3+</sup>	BeMe <sub>2</sub>	MoO <sup>3+</sup>	Hg <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	RO <sup>+</sup>		
Mg <sup>2+</sup>	La <sup>3+</sup>	Si <sup>4+</sup>	BF <sub>3</sub>		Cs <sup>+</sup>	Pt <sup>4+</sup>	I <sub>2</sub>		
Ca <sup>2+</sup>	Cr <sup>3+</sup>	Ti <sup>4+</sup>	BCl <sub>3</sub>		RS <sup>+</sup>	RTe <sup>+</sup>	Br <sub>2</sub>		
Sr <sup>2+</sup>	Co <sup>3+</sup>	Zr <sup>4+</sup>	SO <sub>3</sub>		RSe <sup>+</sup>	RH <sub>3</sub>	Tl(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		
B(OR) <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Sn <sup>2+</sup>	ROSP <sub>2</sub> <sup>+</sup>							
Al(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	RPO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	R <sub>3</sub> C <sup>+</sup>							
Ga(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	ROPO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	RCO <sup>+</sup>							
In(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	RSPO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CO <sub>2</sub>							
<u>Intermediários</u>									
Fe <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Sn <sup>2+</sup>				
Ru <sup>2+</sup>	Au <sup>3+</sup>	SO <sub>2</sub>	NO <sup>+</sup>	B(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>					

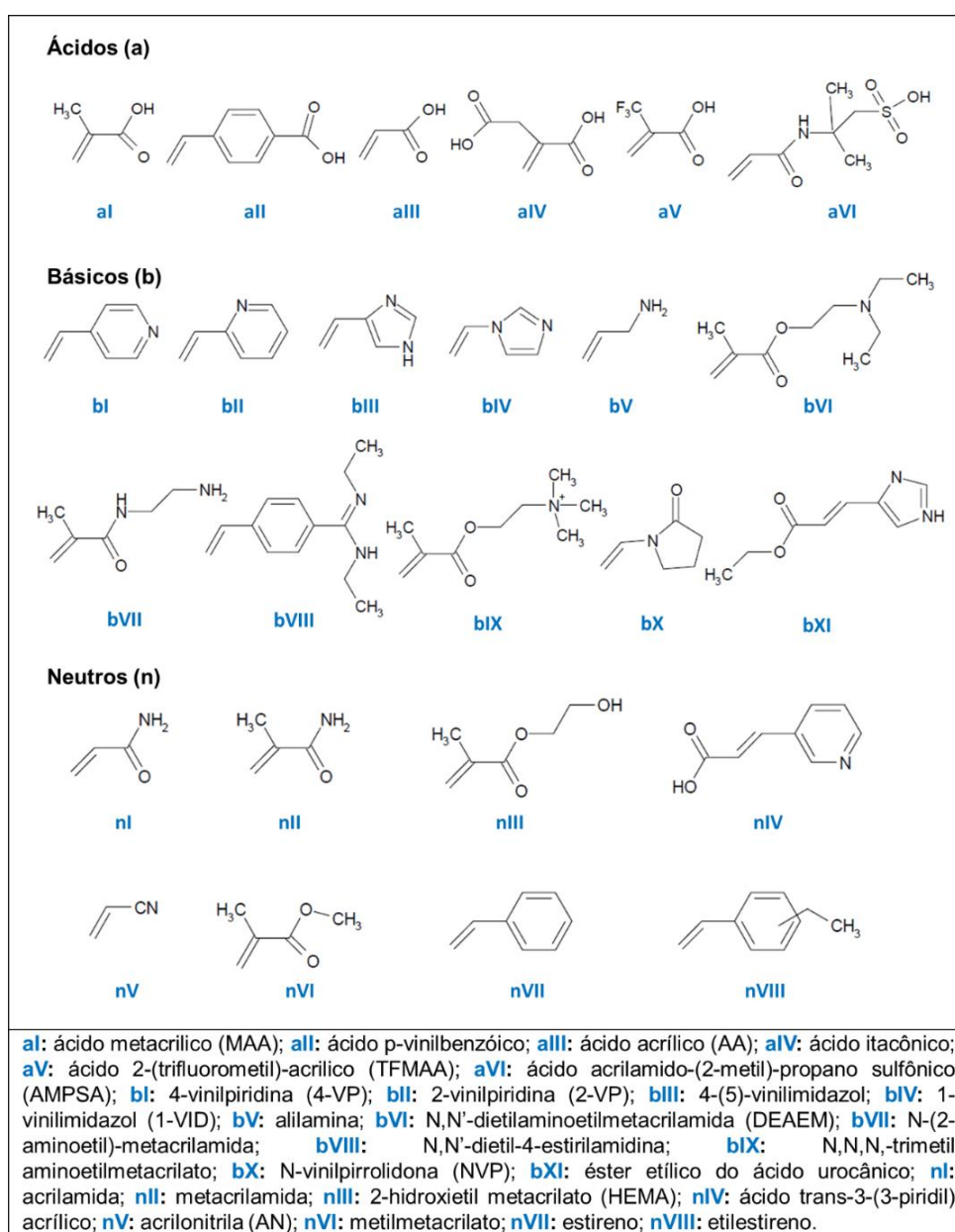
b)

<u>Bases: aníons e moléculas</u>									
<u>Duras</u>					<u>Moles</u>				
HO <sup>-</sup>	H <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	R <sub>2</sub> S	RSH	RS <sup>-</sup>		
H <sub>2</sub> O	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	RO <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>	R <sub>3</sub> As		
ROH	R <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>	RNH <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	R <sub>3</sub> P	CO		
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>					CN <sup>-</sup>	RCN <sup>-</sup>	-R		
					C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	-H		
ROPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	(RO) <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			(RO) <sub>3</sub> P	(RS) <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			
					(RS) <sub>2</sub> P(O)S <sup>-</sup>				
<u>Intermediárias</u>									
Br <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N <sub>2</sub>					
									

Fonte: adaptada de referência [100]

Dentre os monômeros funcionais mais utilizados na síntese de IIP está o ácido metacrílico (MAA) [83,87-90,98], proposto pela primeira vez em 1980 por Arshady e Mosbach [72], em que o doador de elétrons é o átomo de oxigênio. Os monômeros básicos como o 1-vinilimidazol (1-VID) e 4-vinilpiridina (4-VP), que formam complexos com os íons metálicos por meio do átomo de nitrogênio, também são frequentemente utilizados na síntese de IIP. Na Figura 3 é apresentada a estrutura dos monômeros funcionais mais importantes segundo Cormak e Elorza [101], e classificados em ácidos (a), básicos (b) e neutros (n).

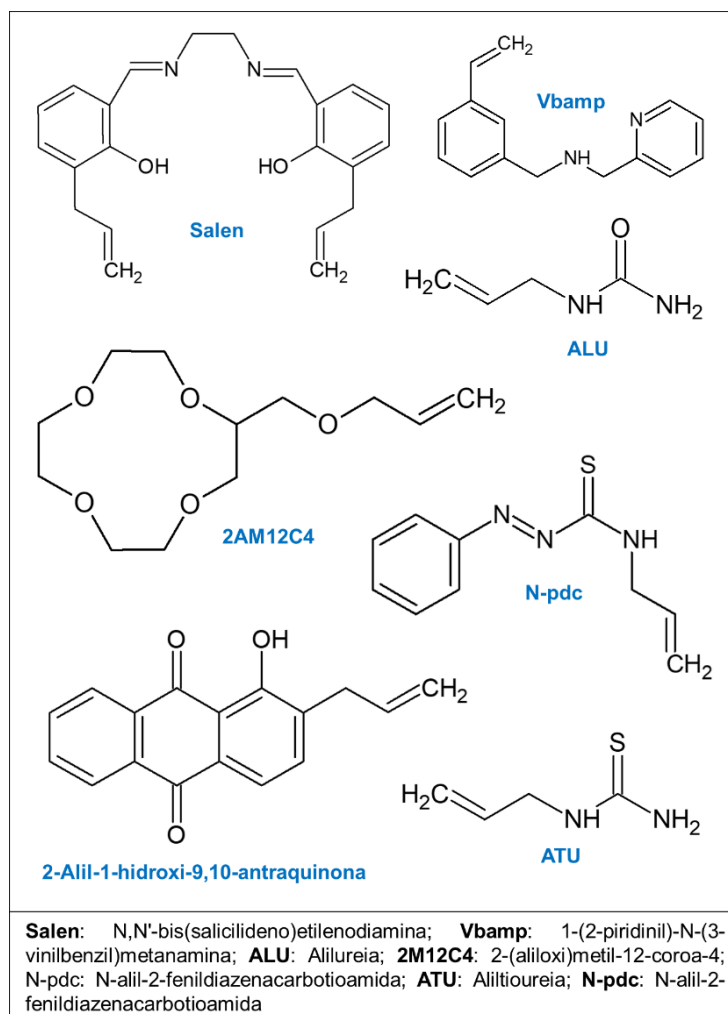
**Figura 3.** Principais monômeros funcionais classificados em (a) ácidos, (b) básicos e (n) neutros.



**Fonte:** adaptada de referência [101]

Ainda, na literatura foram encontrados outros monômeros funcionais utilizados na síntese de IIP [77,91,94-96], que possuem em sua estrutura o átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre como doadores de elétrons, os quais são apresentados na Figura 4.

**Figura 4.** Outros monômeros funcionais utilizados na síntese de IIP.



**Fonte:** o próprio autor.

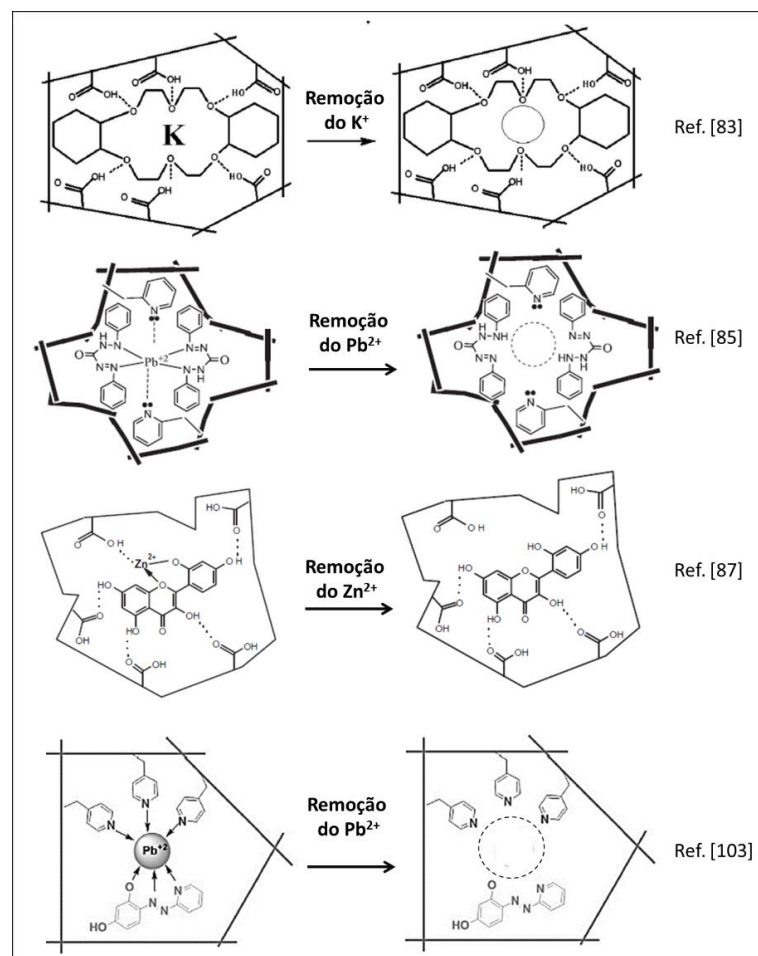
Além de utilizar monômeros funcionais (ligantes vinilados) na síntese de IIP, é possível adicionar juntamente ligantes quelantes não vinilados, que contêm grupos funcionais com maior afinidade pelo íon metálico, a fim de auxiliar a complexação do íon metálico. Este processo é conhecido no contexto de polímeros ionicamente impressos como “*Trapping*”, que traduz “aprisionamento”.

Na síntese de IIP utilizando o processo *Trapping*, o íon metálico é misturado inicialmente com o ligante não vinilado para formar o complexo. Depois, o monômero

funcional é adicionado para completar a complexação do íon metálico. Devido à ausência de grupos polimerizáveis (grupo vinílico) na estrutura do ligante não-vinilado, este não é quimicamente ligado na rede polimérica, porém, é incorporado na matriz do polímero ao interagir com o monômero funcional por meio de forças intermoleculares (ligação de Hidrogênio), bem como, pela interação com o íon metálico.

Rabaji e colaboradores [83] sintetizaram um IIP para o íon  $K^+$  empregando o ligante não vinilado dicitclohexil 18C6, entretanto, Behbahani e colaboradores [85] utilizaram 1,5-difenilcarbazona para complexar o íon  $Pb^{2+}$ . Em outros trabalhos [87,89, 102] foram utilizados os ligantes não vinilados Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona) Dz (Ditizona) e PAR [4-(2-piridilazo)-resorcinol], para complexar os íons  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , respectivamente. A representação esquemática de alguns IIP citados anteriormente, que contem ligantes não vinilados são apresentados na Figura 5.

**Figura 5.** Representações esquemáticas de alguns IIP reportados na literatura contendo ligantes não vinilados.



Fonte: adaptada das referências [83,85,87,103]

Como observado na Figura 5, após a remoção do íon metálico, os autores propõem que o ligante não vinilado permanece na rede polimérica devido às interações de ligação de hidrogênio com o monômero funcional.

Outros ligantes não vinilados contendo o enxofre como átomo doador e empregados em síntese de IIP são a difeniltiocarbazona, tiossemicarbazida e acetaldediotiossemicarbazona [46].

Por outro lado, é importante lembrar que além da natureza química do monômero funcional, a relação estequiométrica entre o íon metálico e o monômero funcional também interfere no processo de impressão química.

Lulinski e colaboradores [95] sintetizaram 10 polímeros para o íon  $\text{Cd}^{2+}$ , 9 com impressão química (IP1 $_{\gamma}$ , IP2 $_{\gamma}$ , IP3 $_{\gamma}$ , IP4 $_{\gamma}$ , IP4 $_{\alpha}$ , IP4 $_{\beta}$ , IP4 $_{\delta}$ , IP4 $_{\epsilon}$ , IP4 $_{\zeta}$ ) e 1 (CP4) como polímero controle, utilizando 4 monômeros funcionais (M1: alilureia; M2: 1-vinilimidazol; M3: acrilamida; M4: aliltioureia) com diferente relação estequiométrica íon metálico : monômero funcional ( $\zeta=1:1$ ;  $\delta = 1:2$ ;  $\gamma = 1:4$ ;  $\beta = 1,8$ ;  $\alpha = 1:16$  e  $\epsilon = 2:3$ ). Entre os polímeros sintetizados, os polímeros contendo o M4 (IP4) apresentaram maior capacidade de adsorção de íons  $\text{Cd}^{2+}$  com relação aos outros três monômeros, em dois valores de pH (1,00 e 6,00). Este comportamento foi atribuído à natureza da ligação química, uma vez que os íons  $\text{Cd}^{2+}$  (ácido mole) apresentam maior interação com o grupo tiocarbonilo (C=S) presente no M4 (base mole) e menor interação com o oxigênio presente em M1, M2 e M3, de acordo com a teoria de Pearson [100].

Referente à relação estequiométrica do íon metálico e o monômero funcional, os autores observaram que a área superficial e a capacidade de adsorção do polímero IP4 aumentou quando a relação estequiométrica foi 1:1 e 2:3, correspondente ao polímeros IP4 $_{\zeta}$  e IP4 $_{\epsilon}$ , com capacidade de adsorção de 3,79 e 2,44  $\mu\text{g g}^{-1}$  e fator de impressão de 13,68 e 8,80 em pH 1,00, entanto que, 1,71 e 1,72  $\mu\text{g g}^{-1}$  com efeito de impressão de 2,55 e 2,56 em pH 6,00, respectivamente. Assim, quanto maior participação dos íons  $\text{Cd}^{2+}$  durante a síntese, maior é a impressão química e capacidade adsortiva. Esses resultados concordam com o estudo realizado por Laatikainen e colaboradores [91], quem sintetizaram polímeros impressos para íons  $\text{Ni}^{2+}$  e um polímero controle (NIP), empregando dois sais [nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ )] como fonte do íon metálico e o monômero funcional  $\text{Vbamp}$  [1-(2-piridinil)-N-(3-vinilbenzil)metanamina] na relação estequiométrica 1:2, 1:4 e 2:1 (íon metálico: monômero funcional) para o polímero IIPNO $_3$ , e 1:2 para o IIPCIO $_4$ . Assim, os autores obtiveram maior capacidade de adsorção com o polímero IIPNO $_3$  em pH 4,00 e 7,00

(7,24 e 11,73 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) quando o íon metálico está em maior proporção que o monômero funcional (2:1). Também, os autores encontraram que o aumento da concentração do monômero funcional na síntese, diminui o fator de impressão química, uma vez que a capacidade adsortiva do IIPNO<sub>3</sub> na relação 1:4 é igual à capacidade de adsorção do polímero não impresso (NIP) em pH 4,00 e 7,00.

### 2.1.3.3 Solvente porogênico

A escolha do solvente porogênico é fundamental na síntese de IIP, pois o solvente além de solubilizar todos os reagentes empregados na síntese para formar uma solução homogênea, não interferindo na interação do complexo íon metálico-monômero funcional, o mesmo tem influência nas características morfológicas do polímero, especificamente na porosidade, daí seu nome de solvente porogênico [104]. Usualmente, deve-se escolher solventes pouco polares e com baixa constante dielétrica para não interferir na formação de sítios seletivos, bem como para evitar fortes interações intermoleculares com as cadeias poliméricas e, como consequência, promovendo a formação de poros na rede polimérica.

Gladi e Rao [105] avaliaram o efeito dos porogênicos 2-metoxietanol, metanol (MeOH), tetrahidrofurano (THF), ácido acético (HAc), dicloroetano (DCE), N,N-dimetilformamida (DMF) e tolueno na capacidade de adsorção de IIP para UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>. Com base nos resultados, o polímero impresso sintetizado em 2-metoxietanol apresentou maior capacidade de adsorção (34,10 mg g<sup>-1</sup>) em relação a MeOH (11,28 mg g<sup>-1</sup>), THF (7,03 mg g<sup>-1</sup>), HAc (27,28 mg g<sup>-1</sup>), DCE (6,80 mg g<sup>-1</sup>), DMF (15,62 mg g<sup>-1</sup>), tolueno (6,62 mg g<sup>-1</sup>) e nos respectivos polímeros não impressos. Meouche e colaboradores [106], sintetizaram vários IIP para íons Ni<sup>2+</sup> no porogênico DMSO (Dimetilsulfóxido) e empregando misturas de acetonitrila -ACN:DMSO (1:1 % v/v) e 2-metoxietanol:DMSO (1:1 % v/v), nomeando os polímeros como IIP-D, IIP-A/D e IIP-M/D, respectivamente. Os autores compararam a estrutura e propriedades de adsorção dos polímeros e observaram que apesar dos polímeros IIP-A/D (134 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) e IIP-M/D (177 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) possuir menor porosidade que o IIP-D (275 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) e os respectivos polímeros não impressos (NIP-D: 380 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, NIP-A/D: 181 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e NIP-M/D: 457 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), estes apresentam maior capacidade de adsorção (23,9 e 22,4 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) e fator de impressão (2,77 e 2,52, respectivamente), mesmo na presença dos íons Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup>.

No Quadro 2 são mostrados os solventes porogênicos mais empregados na síntese de IIP organizados por aumento da polaridade. Esses solventes são classificados em apolar, polar apróticos e polar próticos. É importante lembrar que na síntese de IIP também é comum utilizar como porogênico mistura de solventes, tal como: ACN:DMSO [83], MeOH:DMF [84,97], EtOH:ACN [87], MeOH:EtOH [88], EtOH:2-metoxietanol [91]. Rahman e colaboradores [107] avaliaram o efeito da quantidade dos solventes MeOH ou ACN, bem como da respectiva mistura, nas propriedades adsorptivas e morfológicas de IIP para íons  $Hg^{2+}$ . Assim, os autores observaram que a mistura de MeOH:ACN, como solvente porogênico, forneceu ao IIP maior capacidade de adsorção de íons  $Hg^{2+}$  em relação com os polímeros sintetizados unicamente em MeOH ou ACN, o que foi atribuído ao aumento da porosidade do material. De igual forma, os autores observaram que maior capacidade de adsorção de íons  $Hg^{2+}$  foi obtida com os polímeros que foram sintetizados em maiores quantidades do solvente porogênico. No entanto, ao comparar os resultados obtidos por Gladis e Rao [105] com o trabalho de Rahman e colaboradores [107], descritos anteriormente, pode-se inferir que a capacidade de adsorção de um IIP nem sempre pode ser atribuída a sua porosidade.

**Quadro 2.** Solventes porogênicos comumente empregados na síntese de IIP

Tipo de Solvente	Solvente	Ponto de ebulição (°C)	Constante dielétrica	Momento Dipolar (D)
Apolar	Tolueno [92]	111,6	2,38	0,36
	Clorofórmio [77,89]	61,1	4,81	1,04
Polar Aprótico	Diclorometano (DCM)	40,0	9,1	1,60
	Tetrahidrofurano (THF)	65,0	7,5	1,75
	Dimetilformamida (DMF) [81]	153,0	38,0	3,82
	Acetonitrila (ACN) [85,86]	81,6	37,5	3,92
	Dimetilsulfóxido (DMSO)[99]	189,0	46,5	3,96
Polar Prótico	Metanol (MeOH) [78,80]	64,6	33,0	1,70
	Etanol (EtOH) [74,79,82,90]	78,2	30,0	1,69
	Ácido Acético (HAc)	118,0	6,2	1,74

D: unidade debye. **Fonte:** adaptada de referência [46]

Os solventes polares próticos se caracterizam por conter na estrutura átomos de hidrogênio ligados a elementos eletronegativos (F-H, O-H e N-H) e, portanto, podem formar ligações de hidrogênio, uma vez que esse hidrogênio apresenta caráter ácido. Este tipo de solventes estabiliza os íons metálicos por meio dos pares de

elétrons livres não compartilhados presentes no elemento eletronegativo, enquanto, os ânions são estabilizados por ligações de hidrogênio.

Por outro lado, os solventes polares apróticos não formam ligação de hidrogênio porque a ligação C-H não é polarizável. Não obstante, estes solventes possuem constantes dielétricas e momento dipolar relativamente maiores que os polares próticos. Os solventes polares apróticos também podem estabilizar os íons metálicos ou moléculas por meio dos pares de elétrons livres presentes no átomo de nitrogênio ou oxigênio, e os ânions por forças dipolo permanente ou dipolo induzido. Desta forma, os solventes próticos polares estabilizam melhor os íons metálicos, enquanto, os solventes apróticos polares estabilizam melhor os ânions.

Com relação aos solventes apolares, estes apresentam baixas constantes dielétricas (<15) e baixo momento dipolar. As interações do íon metálico ou das moléculas com o solvente apolar é por meio de forças de dispersão de London.

De forma geral, os solventes polares têm maior constante dielétrica e momentos dipolares que os solventes apolares, o qual lhes permite solvatar com facilidade os íons metálicos ou moléculas polares. O valor da constante dielétrica dos solventes polares varia entre 15 e 80, sendo 80 o valor da constante dielétrica da água.

#### 2.1.3.4 Agente de ligação cruzada

Segundo Cormak e Elorza [101], o agente de ligação cruzada ou reticulante (em inglês cross-linker) desempenha três funções na síntese de polímeros, as quais correspondem a: controlar a morfologia do polímero; estabilizar os sítios de ligação com capacidade de reconhecimento iônico; e conferir estabilidade mecânica à matriz polimérica.

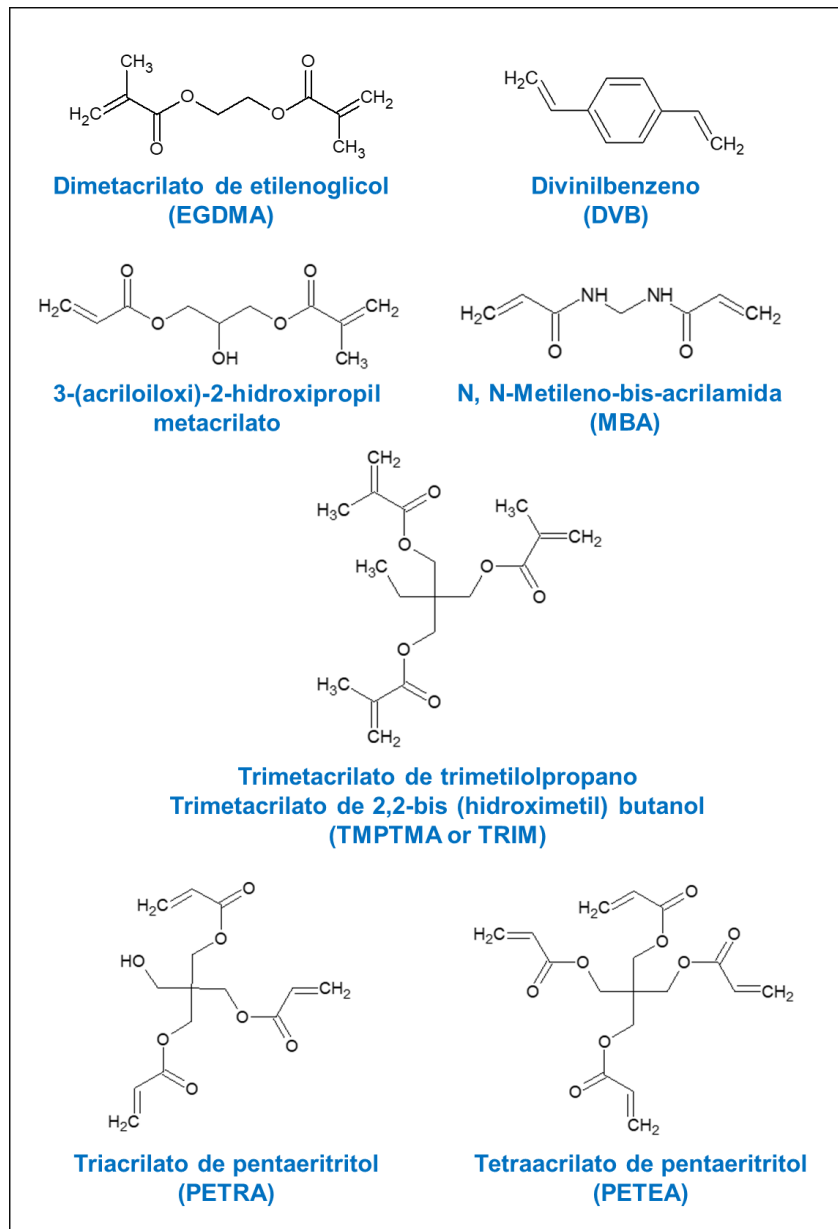
Os reticulantes, da mesma forma que o monômero funcional, também contém na estrutura um ou mais grupos vinílicos. Os mono-vinilados geralmente formam cadeias lineares, enquanto, o bi-, tri- ou tetra- (multifuncionais) formam cadeias ramificadas com diferentes arranjos moleculares.

Kala e colaboradores [108] sintetizaram IIP para  $\text{Er}^{3+}$  (Érbio) utilizando diferentes monômeros funcionais [estireno, 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e metil metacrilato (MMA)] e agentes reticulantes [divinilbenzeno (DVB) e dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA)], que foram nomeados como Estireno-DVB, HEMA-EGDMA e MMA-EGDMA. Dentre eles, o IIP contendo Estireno-DVB apresentou melhor

desempenho que os polímeros baseados em HEMA-EGDMA > MMA-EGDMA em termos de fator de pré-concentração, transferência de massa (capacidade de adsorção) e seletividade pelo íon  $\text{Er}^{3+}$  na presença de Y (Ítrio), Dy (Disprósio), Ho (Hólmio) e Tm (Itérbio), que foi atribuído à maior rigidez do polímero Estireno-DVB devido à presença de anéis aromáticos quando comparado com cadeias alifáticas presentes em HEMA-EGDMA e MMA-EGDMA.

Na Figura 6 são apresentados os agentes de ligação cruzada utilizados na síntese de IIP.

**Figura 6:** Estrutura química dos agentes de ligação cruzada empregados na síntese de IIP.



Fonte: adaptada das referências [46,109]

A revisão na literatura (Quadro 3) permitiu evidenciar que o EGDMA (reticulante bifuncional) é o agente de ligação cruzada mais empregado na síntese de IIP, devido à sua capacidade para formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis, além de permitir a obtenção de materiais porosos [41, 101]. Para isso, altas proporções desse reagente, em relação ao monômero funcional, devem ser utilizadas.

Recentemente, Isikver e Baylav [110] sintetizaram IIP para  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  utilizando o EGDMA ou TRIM [Trimetacrilato de 2,2-bis (hidroximetil) butanol] como agentes reticulantes. Porém os autores não mostraram a influência da estrutura química dos agentes reticulantes sobre as propriedades adsorptivas dos polímeros impressos. Teoricamente espera-se que o TRIM confira ao polímero maior rigidez por ser um reticulante trifuncional, ou seja, possui na estrutura três sítios de interação que lhe permite ligar-se fortemente à matriz polimérica [37,111], quando comparado com o reticulante bifuncional EGDMA. Assim, quanto mais rígida for a matriz polimérica, maior será a estabilidade dos sítios de ligação, facilitando a interação com o íon metálico e transferência de massa (capacidade de adsorção). Desta forma agentes de ligação cruzada tri- ou tetra- funcional como trimetacrilato de 2,2-bis (hidroximetil) butanol (TRIM), triacrilato de pentaeritritol (PETRA) e tetraacrilato de pentaeritritol (PETEA) [109] vem sendo explorados na síntese de polímeros impressos.

#### 2.1.3.5 Iniciador radicalar

A função do iniciador radicalar na síntese de polímeros impressos é produzir monômeros radicais para propagar a reação de polimerização. Estes radicais podem ser gerados sob condições suaves, como o aumento da temperatura (processo termoquímico, 50-60°C) ou incidência de radiação UV (processo fotoquímico, 4-15 °C), devido a que o iniciador radicalar geralmente possui ligações fracas que tem baixas energias de dissociação de ligação. Por tanto, essas condições são determinantes para a escolha do iniciador radicalar, pois os outros reagentes da síntese podem ser termo ou fotossensíveis [101].

É importante mencionar que a síntese de IIP deve ser realizada em ambiente livre de oxigênio, purgando com gás inerte (nitrogênio ou argônio) ou utilizando banho ultrassom, para evitar a formação de radicais de oxigênio que retardam a reação de polimerização radicalar livre [44].

**Quadro 3.** Polímeros impressos encontrados na literatura que foram sintetizados para à adsorção de íons metálicos em amostras com matriz complexa.

Íon Metálico	Ligante não vinilado / Monômero funcional	Agente de Ligação Cruzada	Iniciador Radicalar	Outros reagentes empregados	Solvente porogênico	Estratégia de Polimerização	Capacidade Adsorptiva (mg g <sup>-1</sup> )	Eluente	Técnica de determinação	Aplicação em Amostras	Ref.
1,0 mmol de Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •3H <sub>2</sub> O	0,4 mmol de Acrilamida	1,00 mmol de EGDMA	0,03 mmol de AIBN	Óxido de grafeno (GO)	EtOH	Impressão em Superfície	109,38	HCl	GF AAS	Leite e lagostim (cabeça, garra, rabo)	76
2,4 mmol de Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	2,0 mmol de Salen	65,50 mmol de Estireno e 10,5 mmol de DVB	3,04 mmol de Peróxido de benzoíla (BPO)		Clorofórmio	Suspensão	7,22	EDTA, HCl, HNO <sub>3</sub>	F AAS	Água	77
2,5 mmol de CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	10,0 mmol de Acrilamida	DVB	AIBN		MeOH	Precipitação	NI	HCl	F AAS Cronop.	N.I	78
0,9 mmol de Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •3H <sub>2</sub> O	9,9 mmol de Acrilamida	EGDMA	AIBN	1,2 mmol de CTAB (Surfactante)	EtOH	Bulk	0,84	HNO <sub>3</sub>	F AAS	N.I	79
1,0 mmol de Cu <sup>2+</sup>	2,0 mmol de Ácido itacônico	20,00 mmol de EGDMA	0,30 mmol de AIBN		MeOH	Precipitação	14,80	HCl em EDTA	WD-XRF	N.I	80
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	7,4 mmol de PCC e 0,2 mmol de DAMAS	0,20 mol DVB e 0,05 mol EGDMA	12,18 mmol de AIBN		DMF	Precipitação	8,56	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	F AAS	N.I	81
0,9 mmol de AgNO <sub>3</sub>	1-VID ou 4-VP	EBAm	AMP		EtOH	Precipitação	1-VID: 72,22 e 4-VP: 72,97	Tioureia em HCl, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , EDTA em NaOH	ICP OES	N.I	82
1,0 mmol de KNO <sub>3</sub>	1,0 mmol de DC18C6 / 10,0 mmol de MAA	100,0 mmol de EGDMA	0,30 mmol de AIBN		ACN:DMSO (3:1, v/v)	Precipitação	15,60	HNO <sub>3</sub> , HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fotômetro de Chama	Água (potável, mineral, residual)	83
5,0 mmol de LiCl•H <sub>2</sub> O	1,9 mmol de 2M12C4	25,00 mmol de EGDMA	1,10 mmol de AIBN	2,0 g MH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	MeOH:DMF (1:2 v/v)	Impressão em Superfície	4,08	HCl	F AAS	Água residual	84
0,5 mmol de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,0 mmol de 1,5-difenilcarbazona/ 4,0 mmol de 2-VP	20,00 mmol de EGDMA	0,40 mmol de AIBN		ACN	Bulk	75,40	HCl	F AAS	Peixe, legumes (salsa, manjerição e hortelã) e arroz	85

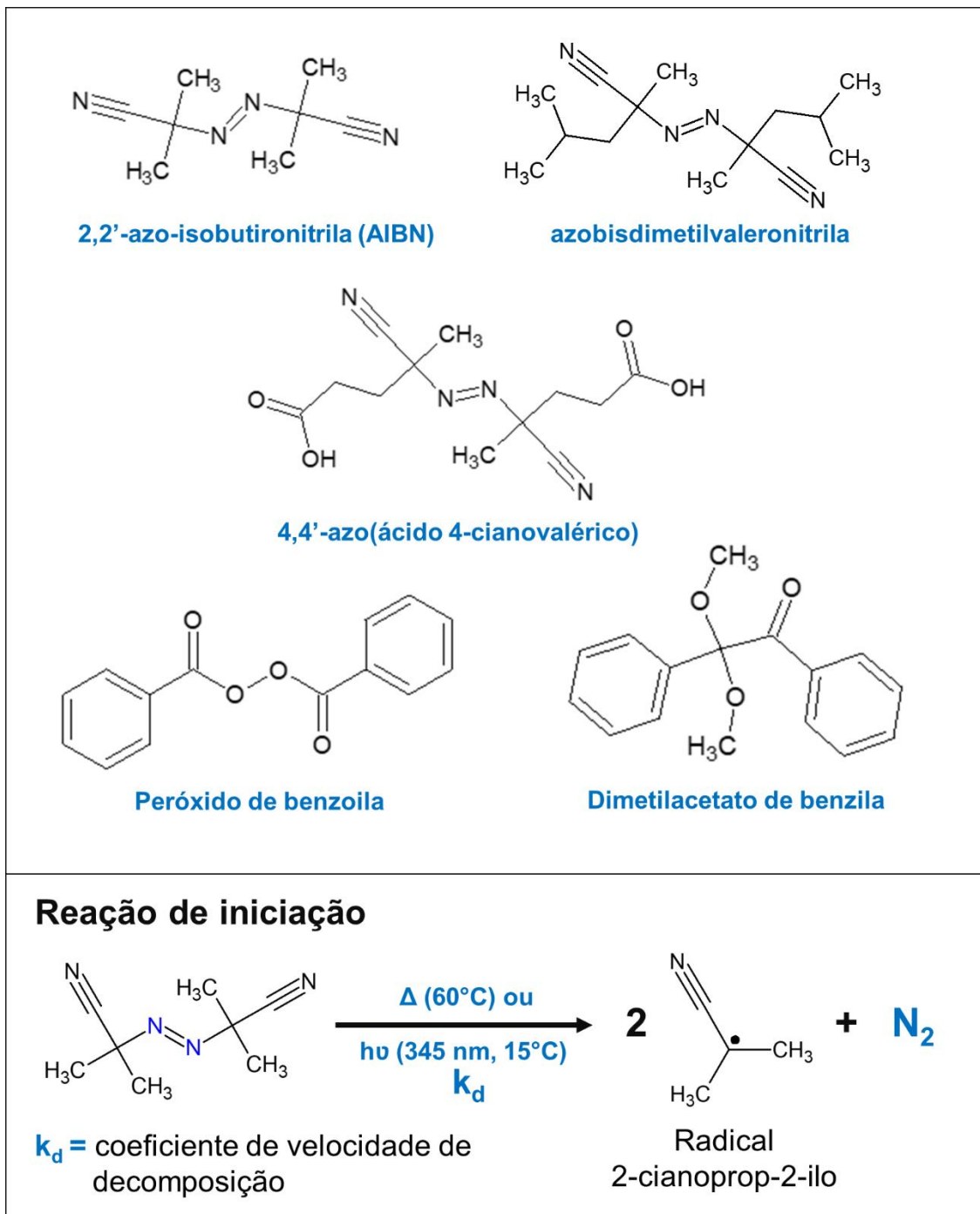
1,0 mmol de PbCO <sub>3</sub>	2,0 mmol de MAA	5,80 mmol de EGDMA	0,30 mmol de AIBN	1,0 g de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> funcionalizado com TEVS	ACN	Impressão em Superfície	51,80	Tioureia em HCl	F AAS	Bebidas (leite, café, chá, suco, limonada, água)	86
1,0 mmol de Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,0 mmol de Morin / 6,0 mmol de MAA	20,00 mmol de EGDMA	0,30 mmol de AIBN		EtOH:ACN (2:1 v/v)	Bulk	0,13	HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , EDTA	F AAS	Suco de laranja e água (residual, rio, torneira)	87
1,0 mmol de Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,0 mmol de N,N'-bis(salicilideno)-o-fenilenodiamina / 4,7 mmol de MAA	30,00 mmol de EGDMA	0,40 mmol de AIBN		MeOH:EtOH (3:1 v/v)	Precipitação	22,11	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub> , HCl	F AAS	Leite, batata, arroz, chá e água mineral	88
2,1 mmol de Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4,0 mmol de Dz / 2,4 mmol de MAA	12,00 mmol de EGDMA	0,73 mmol de AIBN	Membrana de PVDF	Clorofórmio	Impressão em Superfície	37,00	HCl	F AAS	N.I	89
1,0 mmol de Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,0 mmol de 1,5-difenilcarbazona / 4,7 mmol de MAA	30,00 mmol de EGDMA	0,40 mmol de AIBN		EtOH	Precipitação	40,25	HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub>	F AAS	Água (potável, rio, mineral) e tomate	90
1,2 mmol de Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O ou 1,2 mmol de Ni(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Vbamp	23,50 mmol de EGDMA	0,65 mmol de AIBN		EtOH: 2-metoxietanol (1:1, v/v)	Suspensão inversa	IIPNO <sub>3</sub> : 7,04 (pH 4,00) e 11,73 (pH 7,00) IIPCIO <sub>4</sub> : 5,86 (pH 4,00) e 9,39 (pH 7,00)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ICP OES	N.I	91
1,0 mmol de Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4,0 mmol de AMPSA	7,95 mmol de EGDMA	0,61 mmol de AIBN	SG-PMA (Suporte); SDS e n-pentanol (Emulsificadores)	Tolueno	Impressão em Superfície	20,30	HNO <sub>3</sub>	ICP OES	Água	92
1,0 mmol de HgCl <sub>2</sub>	1,0 mmol de 2, 2-dipiridilamina	30,00 mmol de EGDMA	0,40 mmol de AIBN		MeOH	Precipitação	27,96	HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub>	CV-AAS	Água e peixe	93
0,5 mmol de CdI <sub>2</sub>	2,0 mmol de N-pdc	5,29 mmol de EGDMA	0,61 mmol de AIBN	CNT funcionalizados com VS	EtOH	Impressão em Superfície	46,00	Tioureia em HCl, HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	F AAS	Alface, coentro, cebola, espinafre, salsa, repolho e chá	94

0,05 - 0,8 mmol de Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0,8 mmol de ALU ou 1-VID ou Acrilamida ou ATU	4,00 mmol de EGDMA	0,06 mmol de AIBN		MeOH	Bulk	Entre 2,1x10 <sup>-4</sup> e 1,7x10 <sup>-3</sup>	HNO <sub>3</sub>	GF AAS	Água	95
1,0 mmol de CdCl <sub>2</sub> •2,5H <sub>2</sub> O	2,0 mmol de ATU	7,94 mmol de EGDMA	0,43 mmol de AIBN	SG-PMA	ACN	Impressão em Superfície	38,3	HCl, HNO <sub>3</sub>	ICP OES	Água (sintética, torneira, lago, residual)	96
5,0 mmol de Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	10,0 mmol de 1-VID	50,00 mmol de EGDMA	0,61 mmol de AIBN	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> funcionalizadas com TEOS	DMF:MeOH	Impressão em Superfície	21	HNO <sub>3</sub>	F AAS	Água residual	97
UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	SALO / 4-VP e 12,0 mmol de MAA	36,00 mmol de EGDMA	0,30 mmol de AIBN	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> funcionalizadas com AO	2-metoxietanol	Bulk	1,04	HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	ICP-OES	Água residual (estações de tratamento e drenagem ácida de minas)	98
0,1 mmol In <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,15 mmol de AVF	6,36 mmol de EGDMA	0,61 mmol AIBN	SG-PMA	DMSO	Enxerto	45,07	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ICP OES	Água residual (minas)	99

**Salen:** N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina; **PCC:** Bis {5-[(cloreto de N, N-dialil-N-metilamônio)metil] salicilaldoxima} de Cu (II); **DAMAS:** Cloreto de N, N-dialil-N- (3-hidroxi-4-formil) benzil-N-metilamônio; **1-VID:** 1-vinilimidazol; **4-VP:** 4-vinil piridina; **DC18C6:** Diciclohexil 18C6; **MAA:** Ácido metacrílico; **2M12C4:** 2-(aliloxi)metil-12-coroa-4; 2-VP: 2-vinilpiridina; **Morin:** 3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona; **Dz:** Ditizona; **AMP:** 2-aminometilpiridina; **AMPSA:** Ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanosulfônico; **N-pdc:** N-alil-2-fenildiazencarbotioamida; **Vbamp:** 1-(2-piridinil)-N-(3-vinilbenzil)metanamina; **ALU:** Alilureia; **ATU:** Aliltioureia; **SALO:** Salicilaldoxima; **AVF:** ácido vinilfosfônico; **EGDMA:** dimetacrilato de etilenoglicol; **AIBN:** 2,2'-azobis-iso-butironitrila; **DVB:** Divinilbenzeno; **EBAm:** N,N'-metileno-bis-acrilamida; **AMP:** Dicloridrato de 2,2-azo-bis(2-metilpropionamida); **CTAB:** Brometo de Cetrimônio; **Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>:** Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com sílica gel; **TEVS:** Trietoxivinilsilano, **PVDF:** Fluoreto de polivinilideno; **SG-PMA:** Sílica gel funcionalizada com ácido N-propilmalâmico; **SDS:** Dodecil sulfato de sódio; **CNT:** Nanotubos de Carbono; **VS:** Viniltrióxissilano; **TEOS:** Tetraetoxissilano; **AO:** Ácido oleico; **MeOH:** Metanol; **EtOH:** Etanol; **DMF:** Dimetilformamida; **ACN:** Acetonitrila; **DMSO:** Dimetilsulfóxido; **EDTA:** Ácido etilenodiamino tetraacético; **Cronop:** Cronopotenciometria; **F AAS:** Espectrometria de absorção atômica de chama; **GF AAS:** Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; **WD-XRF:** Espectrometria de fluorescência de Raio X dispersivo de comprimento de onda; **ICP OES:** Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado; **CV-AAS:** Espectrometria de absorção atômica de vapor a frio; **N.I.:** Não informado

Na Figura 7 são apresentados os iniciadores radiculares utilizados na síntese de IIP e a representação da reação de iniciação a partir do 2,2'-azo-isobutironitrila (AIBN), que é o iniciador radicalar comumente empregado, formando o radical 2-cianoprop-2-ilo.

**Figura 7.** Estrutura química dos iniciadores radiculares utilizados na síntese de IIP, bem como a representação da reação de iniciação a partir do 2,2'-azo-isobutironitrila (AIBN).



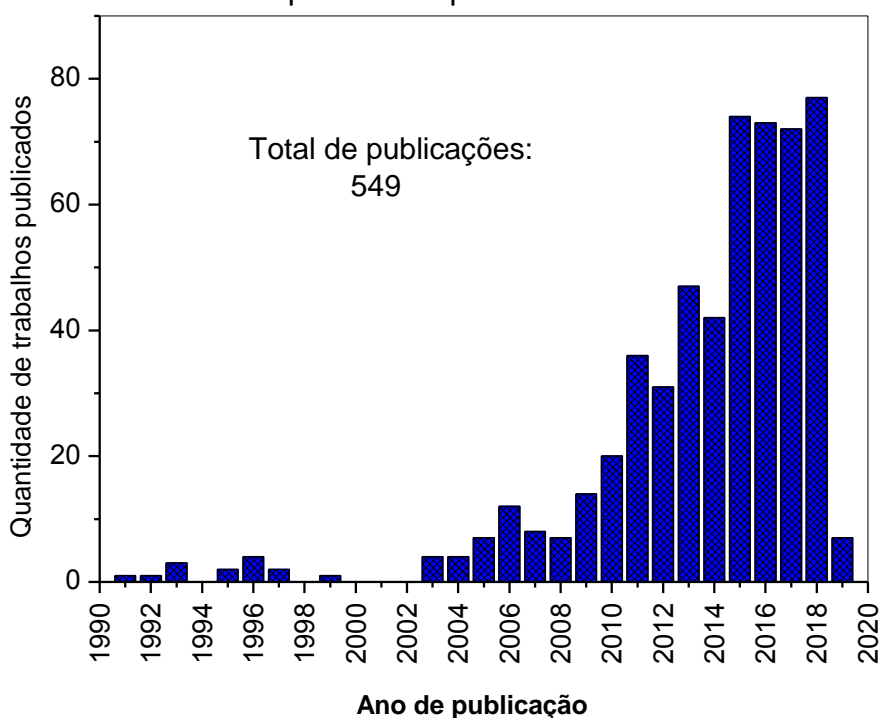
#### 2.1.4 Características Gerais dos IIP

Os polímeros ionicamente impressos são materiais adsorventes com capacidade de reconhecimento de íons metálicos. Estes apresentam diversas vantagens frente a outros adsorventes utilizados em SPE devido à elevada seletividade, custo relativamente baixo dos reagentes da síntese, estabilidade térmica e mecânica, capacidade de fácil regeneração após usar ácidos minerais diluídos na etapa de pré-concentração. Além disso, possibilitam a pré-concentração dos íons metálicos em uma ampla faixa de pH.

A elevada seletividade dos IIP em relação a outros adsorventes é explicada a partir das cavidades formadas (sítios de ligação), que possuem tamanho, carga, geometria de coordenação e número de coordenação específicos, além do efeito de memória, devido à interação entre o *template* (ion metálico) e o monômero funcional por meio de forças eletrostáticas ou ligação covalente coordenada [74]. Porém, a limitação referente ao reconhecimento seletivo do íon metálico está relacionada diretamente com as estratégias de síntese e os métodos de polimerização adotados.

Na Figura 8 pode-se observar que nas últimas duas décadas houve um aumento significativo no emprego dos IIP como adsorventes em estudos de pré-concentração em SPE.

**Figura 8.** Número de trabalhos publicados por ano sobre IIP entre 1991 e 2019.

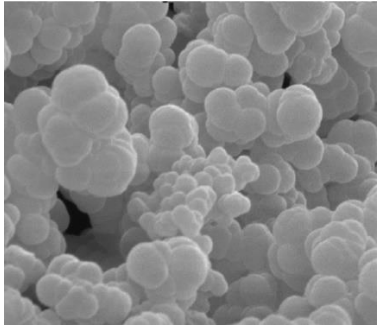
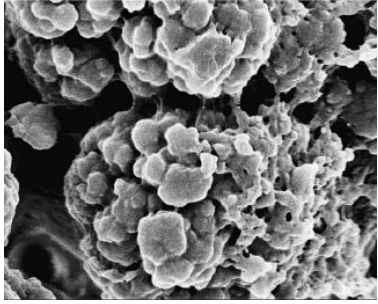
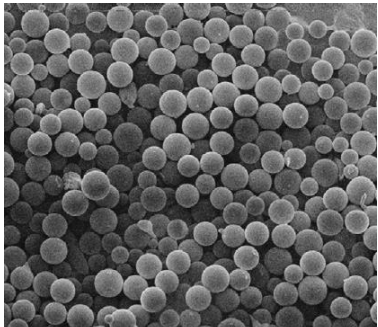


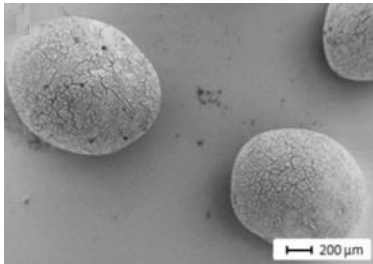
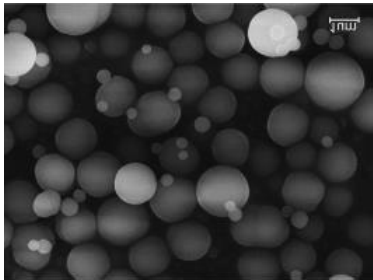
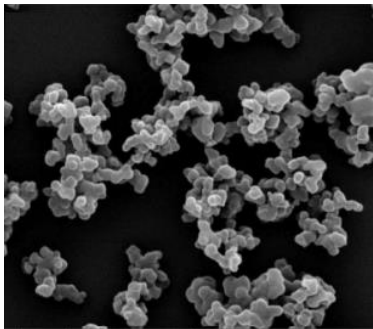
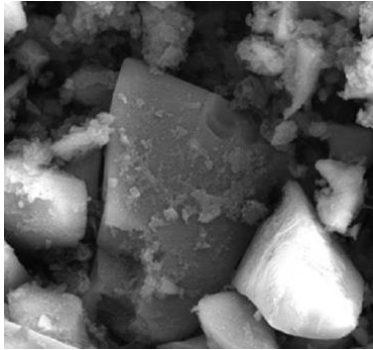
**Fonte:** Web of Science. TÓPICO: (*ion imprinted polymer*). Acesso em: dezembro de 2018.

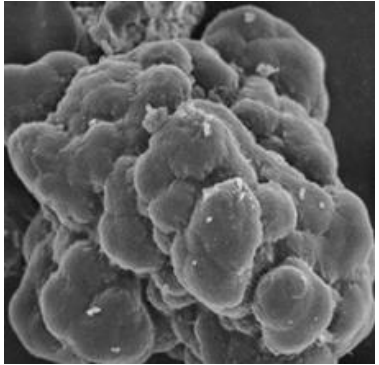
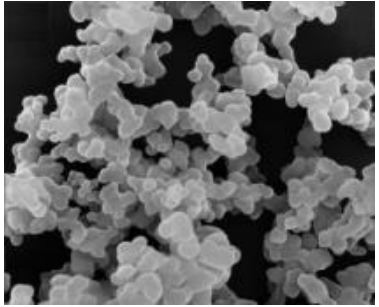
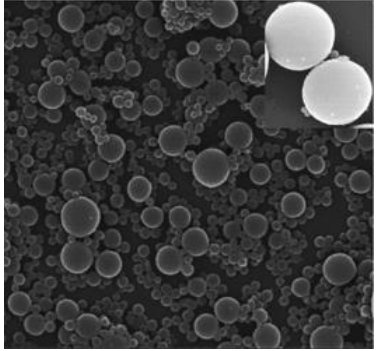
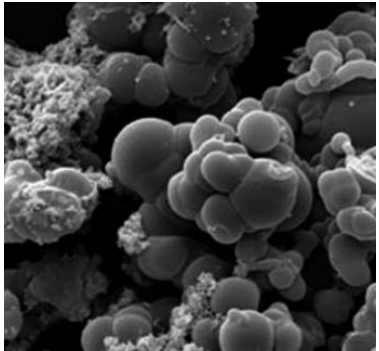
### 2.1.5 Estratégias para Síntese de IIP

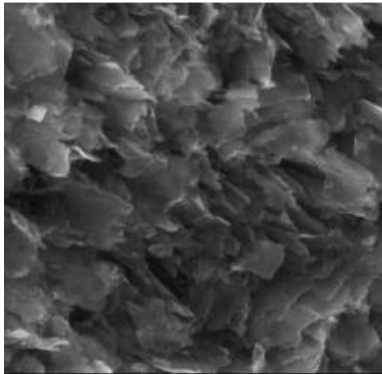
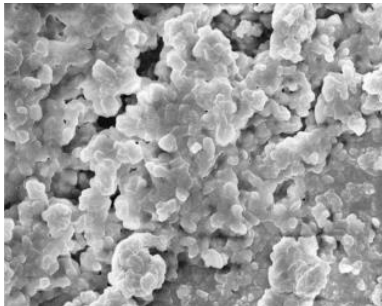
Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para a síntese de polímeros ionicamente impressos. No Quadro 4 são apresentadas essas estratégias, mencionando as características gerais de cada uma, bem como micrografias de MEV para observar a possível morfologia das partículas poliméricas após a síntese.

**Quadro 4.** Estratégias de síntese de IIP e imagens MEV para observar a possível morfologia das partículas poliméricas após a síntese.

Estratégias de Síntese	Características Gerais	Morfologia das Partículas Poliméricas
Polimerização em massa ou "bulk"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A polimerização em <i>bulk</i> é a estratégia tradicionalmente empregada para a síntese de IIP.</li> <li>• A reação de polimerização é realizada em um sistema homogêneo, em que os reagentes (íon metálico, monômero funcional, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar) são dissolvidos em um solvente apropriado dentro de um frasco selado na ausência de oxigênio.</li> <li>• A polimerização é induzida com aumento da temperatura e/ou radiação UV.</li> <li>• O polímero obtido apresenta consistência rígida e heterogênea, sendo necessário empregar, após a síntese, procedimentos de trituração e peneirado antes do uso, a fim de uniformizar o tamanho das partículas.</li> <li>• Conveniente para a extração em fase sólida de íons metálicos.</li> <li>• O efeito de impressão, a capacidade de adsorção e a seletividade destes polímeros são menores em comparação com aqueles obtidos pelas outras estratégias, devido à incompleta remoção do <i>template</i> durante a lavagem após a síntese e ao difícil acesso do íon metálico à cavidade seletiva.</li> <li>• Durante a trituração do polímero podem ser destruídos os sítios de ligação.</li> </ul>	 <p data-bbox="1187 1093 1289 1122">Ref. [79]</p>  <p data-bbox="1187 1476 1289 1505">Ref. [95]</p> <p data-bbox="1086 1525 1385 1615">Partículas relativamente grandes, com tamanho e formatos irregulares.</p>
Polimerização por Suspensão	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os reagentes da síntese são dissolvidos em solvente orgânico apolar e, em seguida, adicionados em uma fase imiscível (normalmente polar) contendo agentes estabilizantes (tensoativo) para formar uma fase dispersiva (com a fase apolar no interior da micela), evitando a coagulação das gotas de emulsão.</li> <li>• A reação de polimerização ocorre dentro das gotas de emulsão, após aplicação de aquecimento ao meio sob agitação, permanecendo em suspensão com a fase dispersiva, que faz com que o polímero seja produzido em formato de esferas.</li> </ul>	 <p data-bbox="1187 2007 1289 2036">Ref. [77]</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A água é usualmente empregada como fase imiscível, e o álcool polivinílico e sais inorgânicos como tensoativos. O estabilizante afeta o tamanho e a forma das partículas, bem como sua cristalinidade e a transparência [111]</li> <li>• Ressalta-se que a água pode solvatar o íon metálico interferindo na complexação, sendo necessário utilizar outra fase dispersiva, empregando um tensoativo de aspecto pastoso a base de polímero de perfluorocarbono [112,113].</li> </ul>	 <p>Ref. [106] Microesferas com tamanho uniforme</p>
<p>Polimerização por Precipitação</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A polimerização por precipitação é semelhante à polimerização por “<i>bulk</i>”, com a diferença do volume de solvente, que é 5 vezes maior, visando impedir a formação de uma massa polimérica.</li> <li>• A mistura dos reagentes com o solvente é desgaseificada e acondicionada em banho maria a temperatura de 60 °C por 24 h ou radiação UV.</li> <li>• A precipitação ocorre quando a microesfera adquire maior densidade que a solução durante a reação, tornando-se insolúvel.</li> <li>• Após a síntese, as microesferas são separadas por centrifugação e lavadas com mistura de solventes para remover o excesso de reagente de síntese.</li> <li>• Não há formação de emulsões</li> </ul>	 <p>Ref. [114]</p>  <p>Ref. [115] Microesferas altamente homogêneas.</p>
<p>Polimerização por Impressão em superfície</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicialmente a superfície de um sólido suporte é ativada ou modificada quimicamente, para ancorar moléculas que possuem na estrutura o grupo vinílico para que ocorra a polimerização.</li> <li>• O material suporte usualmente é de natureza inorgânica (sílica gel ou nanopartículas de magnetita) que são materiais estáveis química e mecanicamente em relação a sólidos orgânicos, tais como celulose.</li> <li>• Todos os reagentes são dissolvidos no solvente e misturados com o sólido suporte. A reação de polimerização começa com o aumento da temperatura ou incidência de radiação UV em atmosfera de nitrogênio.</li> </ul>	 <p>Ref. [96]</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O <i>template</i> pode ser removido facilmente por estar apenas na superfície do material, tornando as cavidades seletivas, mas acessíveis à adsorção do íon metálico.</li> </ul>	 <p>Ref. [97]</p>
<p>Polimerização por Enxerto “grafting”</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nesta estratégia é empregado um suporte polimérico com poros esféricos como base do IIP. O template, monômero bifuncional, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar são dissolvidos no solvente porogênico e adicionados no suporte polimérico até preencher os poros do mesmo.</li> <li>• A reação de polimerização começa com o aumento da temperatura ou incidência de radiação UV em atmosfera de nitrogênio.</li> <li>• Após a polimerização, as microesferas são suspensas, separadas e lavadas.</li> <li>• A polimerização por enxerto apresenta vantagens como a possibilidade de produzir materiais com estrutura organizada de forma bidimensional em monocamada devido à imobilização do monômero, bem como tridimensionalmente por meio da etapa de impressão [37]</li> <li>• A distribuição dos sítios de impressão é consideravelmente melhor em comparação com a polimerização em “<i>bulk</i>”</li> </ul>	 <p>Ref. [116]</p>  <p>Ref. [117]</p> <p>As partículas apresentam tamanho homogêneos.</p>
<p>Polimerização por Sol-gel</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na síntese de IIP pelo procedimento sol-gel, inicialmente a reação ocorre entre o íon metálico e o grupo seletivo do precursor funcional. O precursor (organosílica) e o agente de ligação cruzada (tetraetoxisilano -TEOS), são inicialmente hidrolisados para a formação de uma solução coloidal (sol) de partículas muito pequenas (1-100 nm), que em seguida, se interconectam (policondensação) para formar uma rede porosa rígida (gel) [118].</li> </ul>	 <p>Ref. [119]</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os precursores mais comuns para este procedimento, que atuam como agente reticulante, são o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), o feniltrimetoxissilano (PTMS), o tetrametoxissilano (TMOS) e o tetraetoxissilano (TEOS), responsáveis pela formação da rede polimérica.</li> <li>• Ácidos e bases podem ser utilizados como catalisadores da síntese.</li> <li>• A presença de surfactantes permite controlar o tamanho da cavidade seletiva, facilitando o acesso do íon metálico devido à rápida transferência de massa. Este tipo de procedimento permite obter polímeros com dupla impressão, ou seja, a formação da cavidade seletiva depende da interação íon metálico-precursor funcional e do surfactante.</li> </ul>	 <p style="text-align: center;">Ref. [120]</p>
Polimerização por Emulsão	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A polimerização por emulsão é heterogênea e permite obter partículas com tamanhos na ordem de micrômetros.</li> <li>• Nesta polimerização, a fase orgânica (<i>template</i>, monômero e agente de ligação cruzada) é dispersa em água (fase polar). Para isto, é usado um surfactante como dodecil sulfato de sódio, que promove a formação de micelas, onde o iniciador radicalar fará com que aconteça a polimerização.</li> <li>• A vantagem desta estratégia de polimerização é que não requer a utilização de solventes orgânicos.</li> <li>• De forma similar à polimerização por suspensão, a água pode interferir no processo de impressão.</li> </ul>	 <p style="text-align: center;">Ref. [121]</p>

Fonte: referências [41,44]

### 2.1.6 Reações de Polimerização

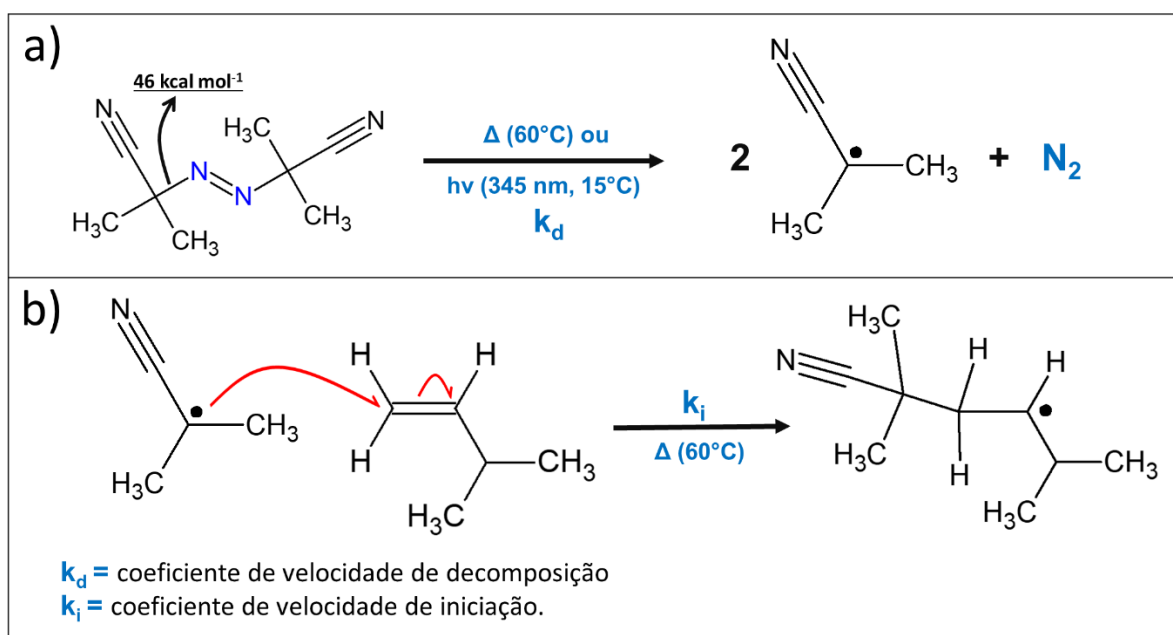
A polimerização é uma reação em que unidades mais simples, chamadas de monômeros, se combinam quimicamente para formar estruturas mais longas. Existem dois tipos de reações de polimerização: por condensação ou por adição, sendo esta última a mais utilizada na síntese de polímeros ionicamente impressos.

Para que os monômeros se liguem por polimerização de adição (poliadição), ou polimerização em cadeia, é necessária a presença de insaturações na estrutura do monômero, em que a ruptura homolítica da ligação  $\pi$  origina uma espécie radicalar.

A reação de polimerização por adição contempla três etapas com cinética diferente: iniciação, propagação e terminação. A iniciação é a etapa mais lenta do ponto de vista cinético e se caracteriza pela formação de radicais livres a partir de um

iniciador radicalar, que deve conter uma ligação química de baixa energia de dissociação para se decompor homolíticamente (Figura 9a). Essa decomposição homolítica pode ser provocada com agentes físicos como calor, radiação ultravioleta ou microondas. Em seguida, a espécie radicalar com hibridização  $sp^2$  reage com o carbono menos substituído que participa da ligação  $\pi$  na molécula do monômero gerando um radical livre que inicia a reação de polimerização (Figura 9b) [122].

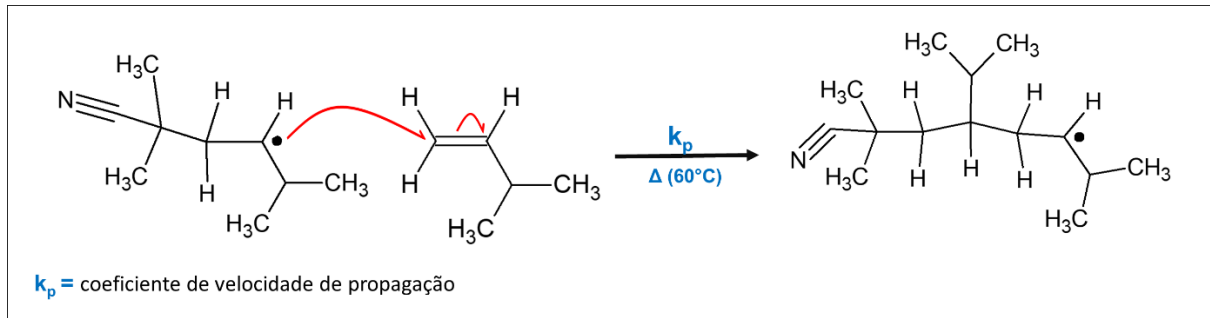
**Figura 9.** Mecanismo da etapa de iniciação em poliadição via radical livre.



Fonte: adaptada de referência [122]

A etapa de propagação ocorre logo após a iniciação e é considerada a etapa mais importante da polimerização, uma vez que é muito rápida, com baixa energia de ativação, e nela ocorre o crescimento da cadeia. Nesta etapa, o centro ativo, formado na iniciação, se adiciona a outro monômero, gerando uma cadeia maior com transferência do centro ativo de monômero a monômero, o qual imediatamente se adiciona a outro monômero pela extremidade, e assim sucessivamente, até ocorrer a terminação [122], conforme apresentado na Figura 10.

**Figura 10.** Mecanismo da etapa de propagação em poliadição iniciado via radical livre.



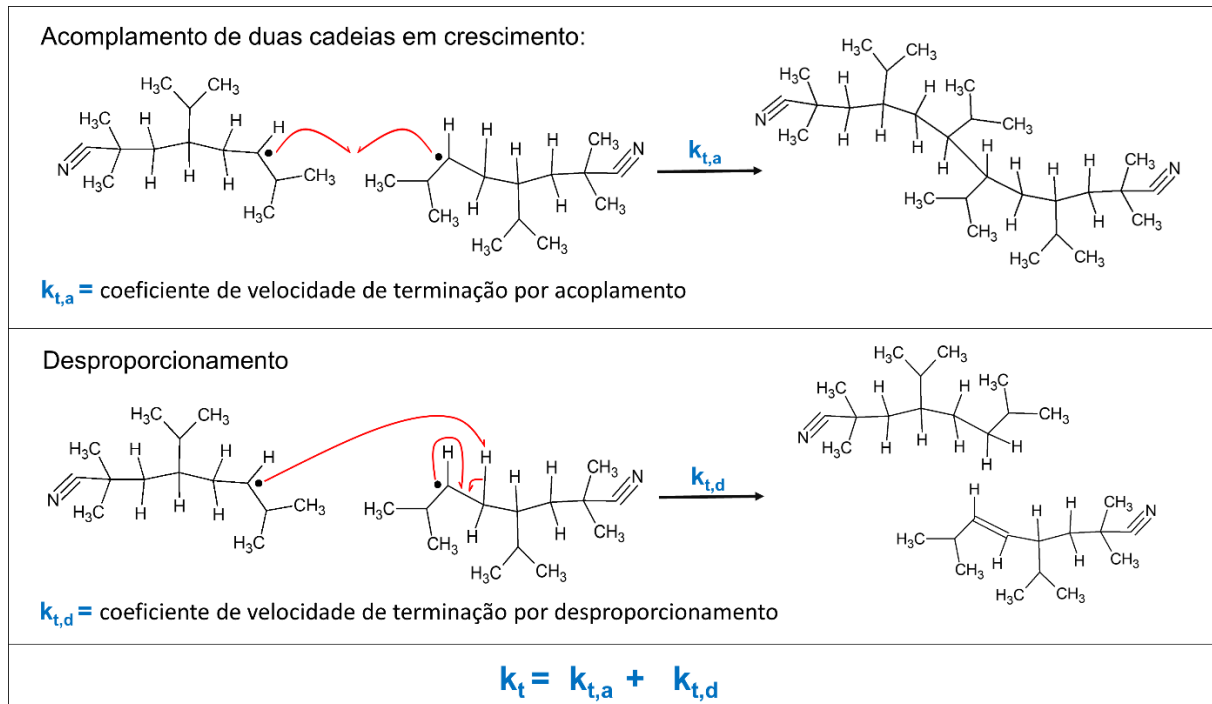
**Fonte:** adaptada de referência [122]

Finalmente, a etapa de terminação ocorre quando há interrupção do crescimento da cadeia pelo desaparecimento do centro ativo devido a:

- Acoplamento ou combinação de dois centros ativos, formando uma ligação simples entre as espécies propagantes;
- Desproporcionamento, que consiste na transferência intermolecular de um átomo de hidrogênio de uma cadeia para outra em crescimento, saturando-se uma extremidade e criando-se uma dupla ligação na extremidade da outra cadeia;
- Abstração de um átomo de hidrogênio de qualquer ponto da cadeia, em que o centro ativo é transferido para compensar a perda desse hidrogênio, formando ramificações;
- Interação do radical livre com outros radicais formados ou moléculas presentes no meio reacional como solvente, iniciador, impurezas ou oxigênio molecular.

Na Figura 11 é apresentado de forma geral o mecanismo da etapa de terminação em poliadição iniciada por via radical livre.

**Figura 11.** Mecanismos da etapa de terminação em poliadição iniciada por via radical livre.



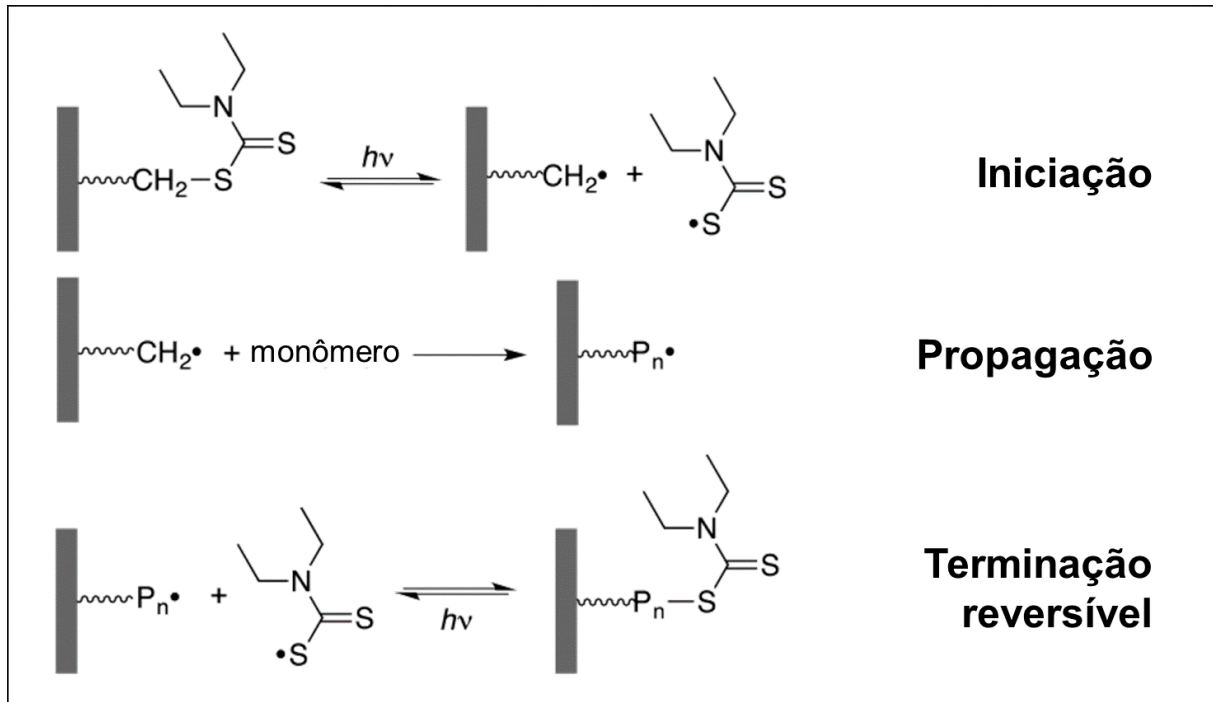
**Fonte:** adaptada de referência [122]

Devido ao curto tempo de vida das cadeias em crescimento e aos diversos eventos que favorecem a terminação da poliadição, a estrutura dos polímeros é de difícil controle, apresentando maior índice de polidispersão, ou seja, maior heterogeneidade do tamanho das partículas [123]. Desta forma, a fim de controlar a estrutura da cadeia polimérica, a polimerização radicalar com desativação reversível (RDRP) surgiu como uma alternativa para o controle da reatividade radicalar propagante [123].

Na polimerização RDRP há dois tipos de radicais, aqueles que propagam a reação, e que podem sofrer o evento de terminação, e os que estão ligados a agentes que controlam a terminação da polimerização. Quanto maior a concentração dos agentes controle, menor a probabilidade de interação entre os radicais propagantes. Desta forma, é possível obter polímeros com maior massa molar e altas taxas de conversão da reação, além de baixos índices de polidispersão.

Dentre a polimerização RDRP encontrasse o procedimento Iniferter (do inglês, Initiator-transfer agent-terminator) em que o agente controle do centro propagante participa da iniciação, transferência de radicais e terminação dos centros propagantes (Figura 12) [124].

**Figura 12.** Mecanismo para polimerização em superfície por Iniferter.



Fonte: adaptada de referência [125]

O agente controle é uma substância, como o ditiocarbamato, que por efeito da temperatura ou radiação ultravioleta forma dois tipos de radicais. A função do primeiro radical é adicionar-se ao monômero, por meio da ligação *pi*, para iniciar uma cadeia propagante, enquanto, o segundo tem a função de controlar a entrada de outras moléculas do monômero por meio de ativações/desativações rápidas da ligação C=S do ditiocarbamato. Não obstante, os fragmentos do radical ditiocarbamato são capazes de iniciar novas cadeias e seu equilíbrio de desativação reversível não é rápido o suficiente para controlar a entrada de monômeros na cadeia em crescimento, aumentando a polidispersão do polímero formado [126,127].

Huang e colaboradores [128] reportaram a síntese de um IIP para íons  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a superfície de um papel empregando a polimerização por enxerto e o procedimento RDRP por Iniferter para o desenvolvimento de um sensor. Na síntese do polímero foi utilizado  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  como *template*, MAA como monômero funcional, DMSO como solvente porogênico, EGDMA como agente de ligação cruzada, dietilditiocarbamato de sódio trihidratado como agente controle. A síntese foi realizada por fotopolimerização utilizando radiação ultravioleta com  $\lambda = 254$  nm durante 12h, resultando uma membrana com impressa iônica superficial. A partir da caracterização morfológica, os autores observaram que o polímero foi formado

apenas na superfície do papel sem afetar a estrutura de rede tridimensional deste. Além disso, muitas partículas irregulares foram observadas na membrana do IIP. No entanto, para o polímero não impresso (NIP) apenas uma membrana uniforme foi formada. Os autores empregaram a espectroscopia de fotoelétrons de Raios-X (XPS) para analisar a composição superficial do IIP. A presença de dois picos em 163,1 e 165,5 eV foram atribuídos ao enxofre (S) dos grupos C-S e C=S devido à modificação do iniferter no papel.

Referente ao estudo de adsorção, o IIP apresentou uma capacidade máxima de adsorção ( $155,2 \text{ mg g}^{-1}$ ) maior em comparação com IIP reportados para  $\text{Cd}^{2+}$  e/ou outros íons (Quadro 3) sintetizados por polimerização radicalar convencional.

### 2.1.7 Classificação dos IIP

Os polímeros ionicamente impressos podem ser classificados de acordo com a natureza química dos reagentes empregados na síntese. Eles podem ser orgânicos, inorgânicos ou híbridos (orgânicos-inorgânicos). No Quadro 5 são apresentadas algumas características e propriedades de IIP segundo sua natureza química.

**Quadro 5.** Classificação dos IIP segundo a natureza química de seus componentes.

Natureza dos IIP	Síntese	Características/Propiedades
Orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podem ser sintetizados pela polimerização em <i>bulk</i>, precipitação e suspensão.</li> <li>• Frequentemente o AIBN (2,2'-azobisisobutironitrila) e utilizado como iniciador radicalar, e o DVB (divinilbenzeno) e EGDMA (dimetacrilato de etilenoglicol) como agentes de ligação cruzada.</li> <li>• Ligantes vinilados e ligantes quelantes não vinilados são utilizados para a complexação do íon metálico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os primeiros IIP foram de natureza orgânica [46], empregando poli(etilenoimina), poli(vinilpiridina), álcool poli(vinílico) e poli(acrilato) para reconhecimento de <math>\text{Cu}^{2+}</math>, <math>\text{Fe}^{3+}</math>, <math>\text{Co}^{2+}</math>, <math>\text{Zn}^{2+}</math>, <math>\text{Ni}^{2+}</math> e <math>\text{Hg}^{2+}</math>.</li> <li>• Possuem rede polimérica rígida altamente reticulada e quimicamente estável em ampla faixa de pH.</li> <li>• Existe grande variedade de monômeros disponíveis comercialmente.</li> <li>• Podem ser empregados em extração em fase sólida (SPE), membranas de separação e sensores. No entanto, em SPE, os polímeros orgânicos podem encolher ou inchar quando são expostos a diferentes solventes, com resistência à passagem de líquidos, gerando empacotamento das colunas.</li> <li>• Geralmente apresentam capacidade de retenção em torno de 70 a 100%.</li> </ul>

<p>Inorgânicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sintetizados por meio da polimerização sol-gel.</li> <li>• Como agente reticulante é utilizado o tetraetoxissilano (TEOS).</li> <li>• Precursores bifuncionais, como 3-(2-aminoetilamino)-propiltrimetoxissilano (AAPTS) são empregados para complexar o íon metálico e copolimerizar com o TEOs.</li> <li>• Não é necessário o uso de iniciadores radiculares, portanto, a síntese pode ocorrer na presença de oxigênio molecular com aquecimento de 90 °C.</li> <li>• A catalise acida tem sido mais utilizada na síntese destes polímeros.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polímeros sintetizados na presença de catalisadores ácidos leva à formação de partículas com menor tamanho e agregação, e maior área superficial e porosidade.</li> <li>• Apresentam estabilidade reduzida em meio aquoso com baixo ou alto valor de pH.</li> <li>• O excesso de catalisador ácido pode conduzir a formação de estruturas microporosas.</li> <li>• A cinética de adsorção/dessorção torna-se desfavorável devido aos microporos que compõem o material, resultando lenta transferência de massa do analito.</li> </ul>
<p>Híbridos (orgânicos-inorgânicos)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Existem várias possibilidades de síntese, fundamentadas em dois tipos de interação: interações fracas entre os componentes, tais como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações <math>\pi</math>-<math>\pi</math> ou eletrostáticas; ou por ligações químicas fortes tais como ligações covalentes ou íon-covalentes.</li> <li>• São preparados principalmente pela polimerização sol-gel, usando o TEOs como agente reticulante e moléculas orgânicas capazes de interagir com o íon metálico para sua incorporação na rede polimérica. Neste caso, o componente orgânico não é polimerizável, pois apenas é ligado covalentemente à matriz inorgânica.</li> <li>• Empregando outras estratégias de polimerização, é possível associar o efeito dos monômeros orgânicos vinilados (agentes de acoplamento) com os precursores inorgânicos a fim de conferir maior seletividade ao polímero.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Materiais homogêneos macroscopicamente, apresentando propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem.</li> <li>• Apresentam área superficial grande e tamanho de poros entre 2 e 15 nm.</li> <li>• São estáveis térmica e quimicamente devido a sua composição inorgânica, com a funcionalidade e flexibilidade de dos polímeros orgânicos. Assim, podem ser empregados em uma ampla faixa de pH.</li> <li>• Possuem baixa densidade, com relação aos polímeros orgânicos, e longa durabilidade.</li> <li>• Podem ser utilizados em extração de fase sólida para íons metálicos.</li> </ul>

Fonte: referência [37]

## 2.2 MEIOS OU MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM)

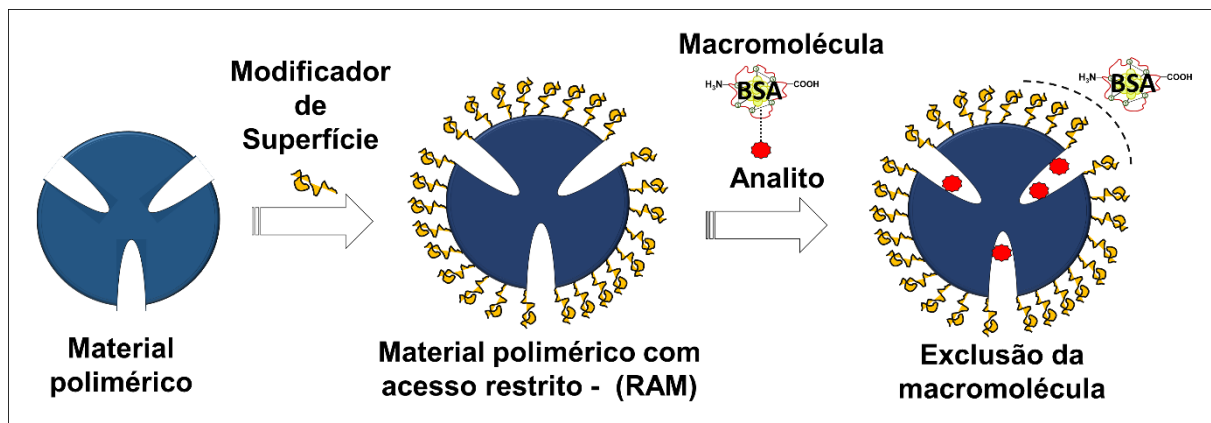
Na extração em fase sólida (SPE), a adsorção de moléculas ou íons metálicos (analito) presentes em amostras com matriz complexa não é um processo simples e as vezes torna-se inviável. Este fato é devido aos componentes da matriz,

especificamente as macromoléculas, que são adsorvidas na superfície do adsorvente, impedindo a adsorção do analito ou causando entupimento da coluna quando o material adsorvente é utilizado como recheio, o que resulta em perda da capacidade adsortiva e seletiva do material.

Nesse contexto, foram propostos os meios ou materiais de acesso restrito (RAM, do inglês *Restricted Access Media or Material*) por Hagestam e Pinkerton [51], fazendo referência a adsorventes poliméricos contendo na superfície externa grupos funcionais e/ou proteínas capazes de excluir quantitativamente as macromoléculas, enquanto que a superfície interna consegue reter as moléculas de baixo peso (analitos) [38,52,53]. Assim, o emprego dos RAM em SPE, acoplado a sistemas de análise de fluxo, permite a análise direta de amostras biológicas sem tratamento prévio.

Na Figura 13 é apresentado o esquema geral da exclusão de macromoléculas e adsorção do analito empregando um material polimérico com acesso restrito.

**Figura 13.** Representação esquemática de um material polimérico com acesso restrito (RAM).



Fonte: adaptada das referências [38,53]

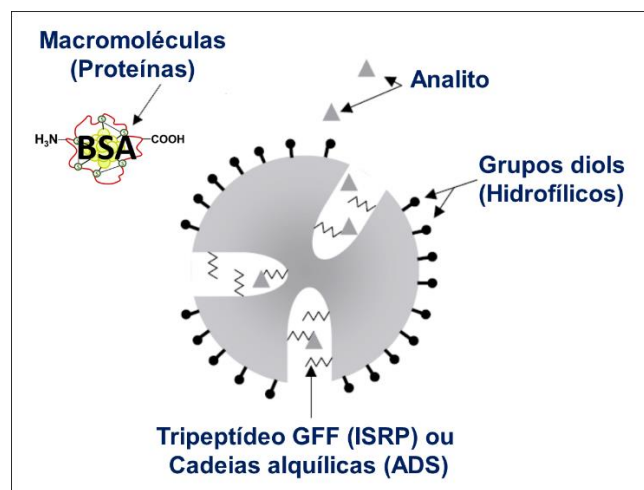
Os RAM podem ser classificados de acordo com o mecanismo de exclusão das macromoléculas, que pode ser por meio de uma barreira física, química ou uma combinação das duas. O mecanismo de exclusão por barreira física está associado com o tamanho de poro, sendo utilizados materiais com poros (geralmente de 60 Å) que permitem apenas a entrada de moléculas pequenas, excluindo as macromoléculas. Alguns materiais que utilizam o mecanismo de exclusão por barreira física são os ISRP (do inglês, *Internal Surface Reversed-Phase*), ADS (do inglês, *Alquil-Diol-Sílica*) e SPS (do inglês, *Semi-Permeable Surface*).

O material ISRP foi proposto em 1985 por Hagestam e Pinkerton [51] e comercializado em 1986 como adsorvente polimérico para a determinação de fenitoína (fármaco) em soro ou plasma por injeção direta. Este material corresponde a uma sílica porosa com a superfície externa coberta por grupos hidrofílicos (diol-glicil), para limitar a adsorção de proteínas, e uma fase hidrofóbica (tripeptídeo Glicina-L-Fenilalanina-L-Fenilalanina ou GFF) apenas na superfície interna. Desta forma, quando o soro ou plasma são injetados diretamente pelo ISRP, as proteínas com tamanho maior que 20000 Da, como a albumina (65600 Da), são excluídas da superfície interna por mecanismo físico, pois o diâmetro de poro das partículas é aproximadamente 8 nm. Assim, apenas é adsorvido o analito (fenitoína) na superfície interna por meio de interações com elétrons  $\pi$ . No entanto, foi necessário modificar os poros da superfície interna com GFF-II para melhorar a capacidade de retenção dos ISRP.

Em relação as fases ADS, estas foram introduzidos por Boos e colaboradores em 1995 [129], em que grupos hidrofílicos diols foram incorporados na superfície externa de sílica, enquanto que, cadeias alquílicas (C4, C8 ou C18) na superfície interna, tornando-a hidrofóbica. Sua estrutura é semelhante ao ISRP GFF-II, porém com maior eficiência na retenção do analito e com menor tamanho do poro (6 nm). Comercialmente as fases ADS tem o nome de LiChrospher ADS® e são produzidas pela Merck.

Na Figura 14 é apresentada a representação esquemática das fases utilizadas como RAM para exclusão de macromoléculas por mecanismo físico.

**Figura 14.** Representação esquemática das fases ISRP e ADS



Fonte: adaptada da referência [38]

Além desses materiais, existem os RAM com barreira química, os quais são obtidos ao revestir a camada externa do material adsorvente com grupos funcionais hidrofílicos, formando uma barreira de água que restringe o acesso de proteínas e macromoléculas hidrofóbicas, permitindo a percolação dos analitos até os sítios de ligação (hidrofóbicos) do material adsorvente.

O primeiro RAM com barreira química foi sintetizado por Gish e colaboradores em 1988 [130] e comercializado como Hisep® pela Sigma-Aldrich. Este adsorvente corresponde a uma sílica que contém uma camada externa composta por uma rede de polioxietileno, enquanto, grupos contendo anéis aromáticos (fenilo) foram incorporados nos poros do material. Portanto, a rede de polioxietileno impede a difusão das macromoléculas ao interior dos poros e os analitos podem interagir com o grupo fenilo por meio de interações hidrofóbicas e ligação  $\pi$ - $\pi$ .

Desilets e colaboradores [52] desenvolveram as fases SPS (do inglês, *Semi-permeable surface*), que apresentam agrupamentos do polímero polioxietileno (hidrofílico) na superfície externa das partículas e agrupamentos alquílicos (hidrofóbicos) na superfície interna dos poros, incorporados por meio de ligações covalentes. Este tipo de material é comercializado atualmente por Regis Technologies.

Nas fases SPS, a camada polimérica, além impedir a adsorção das macromoléculas na superfície externa do material, é capaz de reter analitos hidrofílicos por meio de ligações de hidrogênio, enquanto que os analitos hidrofóbicos conseguem atravessar a camada semipermeável até chegar aos poros do suporte e interagir com os sítios ativos [131].

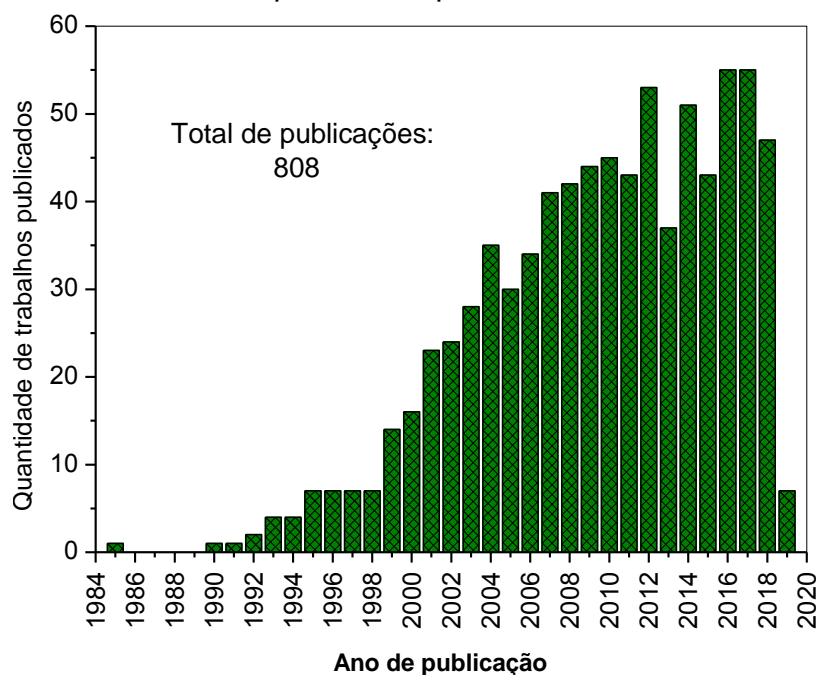
Yoshida e colaboradores [132] prepararam colunas contendo RAM, em que a proteína albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) foi incorporada na camada externa de sílica para a determinação de fármacos em amostras de sangue. Nessa mesma abordagem, Menezes e Felix [133] imobilizaram BSA ou HSA (albumina de soro humano) sobre a sílica, estabilizadas com ligações cruzadas com glutaraldeído, para determinação de pesticidas (bendiocarbe, metil paration, metomil e pentaclorofenol) em leite cru, obtendo porcentagens de recuperação maiores a 99,6% dos pesticidas citados.

Haginaka e Wakai [134,135] desenvolveram as fases MFP (do inglês, *Mixed-Function Phase*), adicionando radicais hidrofóbicos (fenila, butila ou octila) juntamente com radicais hidrofílicos (diol) tanto na superfície externa dos poros das partículas do suporte quanto na superfície interna. Devido à presença de radicais hidrofílicos e

hidrofóbicos, esses materiais foram utilizados para reter fármacos e metabólitos polares, bem como apolares.

Na Figura 15 é apresentada a evolução do número de trabalhos publicados sobre materiais com acesso restrito (RAM) nas últimas 3 décadas, em maior proporção quando comparado com os IIP.

**Figura 15.** Número de trabalhos publicados por ano sobre RAM entre 1985 e 2019.



**Fonte:** Web of Science. TÓPICO: ("Restricted Access Material") or TÓPICO: ("Restricted Access Media"). Acesso em: dezembro de 2018.

Como exposto, os RAM foram inicialmente propostos para adsorção de moléculas presentes em amostras biológicas e ambientais, sendo empregados em pré-colunas como etapa de clean-up para posterior injeção da amostra no sistema cromatográfico. No entanto, em relação à adsorção de íons metálicos com RAM, na literatura foram encontrados apenas dois trabalhos.

Barbosa e colaboradores [68] imobilizaram BSA sobre nanotubos de carbono (CNT) oxidados para obter nanotubos de carbono com acesso restrito (RACNT). Os autores confirmaram a imobilização da BSA e a presença de sítios de adsorção de íons  $Pb^{2+}$  empregando as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM, do inglês *High-Resolution Transmission Electron Microscopy*), microscopia eletrônica de varredura (MEV ou SEM, do inglês *Scanning Electron Microscope*) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia. O RACNT apresentou capacidade para extrair íons  $Pb^{2+}$  e excluir 100,0% proteínas séricas

diretamente do soro de sangue humano sem empregar etapas de pré-tratamento. A capacidade máxima de adsorção do RACNT para os íons  $Pb^{2+}$  foi  $34,5 \text{ mg g}^{-1}$  com fator de pré-concentração de 5,5 em sistema de pré-concentração *on-line* com determinação por espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS), enquanto a exclusão das proteínas foi monitorada por UV-Vis em  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

Yan e colaboradores [69] sintetizaram nanopartículas magnéticas ( $Fe_3O_4@SiO_2$ ) funcionalizadas com 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) contendo acesso restrito ( $Fe_3O_4@SiO_2@PAR$ -MNPs) para análise direta de íons  $Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$  e  $Pb^{2+}$  em amostras de urina humana e soro, com determinação por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A partir dos dados texturais, o  $Fe_3O_4@SiO_2@PAR$ -MNPs apresentou área superficial, volume total de poro e diâmetro médio de poro de  $99,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ,  $0,47 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e  $6,14 \text{ nm}$ , respectivamente. Por outro lado, a capacidade máxima de adsorção obtida para os íons  $Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$  e  $Pb^{2+}$  foi 62,9, 56,6, 33,7, 36,9 e  $43,3 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente, com fator de pré-contração de 30,0. Os autores concluem que o  $Fe_3O_4@SiO_2@PAR$ -MNPs apresentou elevada capacidade para exclusão de proteínas com satisfatória adsorção de íons metálicos.

### 2.3 POLÍMEROS IONICAMENTE IMPRESSOS COM ACESSO RESTRITO (IIP-RAM)

A associação de adsorventes que apresentam elevada seletividade, como os polímeros impressos, com materiais que possuem satisfatória capacidade para excluir macromoléculas (acesso restrito) são amplamente encontrados na literatura para a determinação de moléculas, e conhecidos como MIP-RAM (polímeros molecularmente impressos contendo acesso restrito) [54,56,63-67]. Segundo a base de dados *Web of Science*, utilizando o termo "*Molecularly Imprinted Polymer and Restricted Access Material*", foram publicados 72 trabalhos sobre MIP-RAM entre os anos 1999 e 2019. Porém, para a adsorção de íons metálicos empregando polímeros ionicamente impressos com acesso restrito (IIP-RAM), foram encontrados apenas três trabalhos.

Cui e colaboradores [70] sintetizaram um IIP-RAM para adsorção de íons  $Cu^{2+}$  em amostras de urina humana e soro sanguíneo. O adsorvente apresentou capacidade máxima de adsorção de  $15,9 \text{ mg g}^{-1}$  com fator de pré-concentração de 30,0 e satisfatória exclusão de macromoléculas. A partir dos parâmetros texturais, o

IIP-RAM exibiu uma área superficial de  $86,3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , com volume total de poro de  $0,17 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e diâmetro médio de poro de  $6,29 \text{ nm}$ . Os autores relatam que o IIP-RAM mostrou capacidade seletiva para os íons  $\text{Cu}^{2+}$  na presença de diferentes íons ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ ) em diferentes concentrações ( $0,2$ ,  $0,5$ ,  $1,0$ ,  $2,0$  e  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou dois trabalhos sobre IIP-RAM, um para íons  $\text{Cu}^{2+}$  [136] e outro para íons  $\text{Cd}^{2+}$  [137], com exclusão de proteínas e ácido húmico, respectivamente. Nas duas publicações foram reportados apenas os resultados obtidos na caracterização dos materiais e o estudo e seletividade dos IIP-RAM. Espera-se, ainda, publicar os resultados referentes ao método analítico proposto para determinação de Cu e cádmio em amostras reais.

#### 2.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM LEITE

O leite é um fluido biológico que desempenha um papel importante na nutrição infantil, uma vez que é a única fonte inicial de alimento, constituído principalmente por água, gordura, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, necessários para o crescimento e desenvolvimento normal das crianças [138].

As proteínas do leite se dividem em dois grupos. O grupo maioritário é da caseína ( $75,0$  a  $85,0\%$ ), incluindo os polipeptídeos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ , em que quase todas as caseínas se encontram associados ao cálcio e fosforo [139]. O segundo grupo são as proteínas solúveis do soro lácteo ( $15,0$  a  $22,0\%$ ), que correspondem a  $\beta$ -lactoglobulinas,  $\alpha$ -lactoalbuminas, albuminas séricas e as imunoglobinas. Não obstante, a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina são nutricionalmente melhores que a caseína, devido ao maior conteúdo de aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano [140].

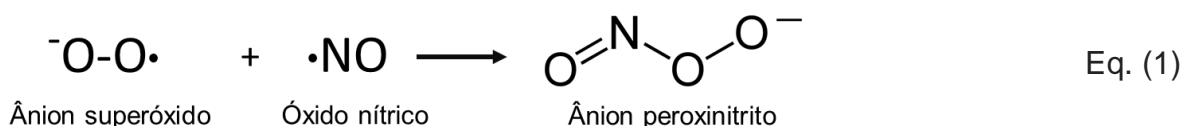
O leite bovino contém normalmente de  $0,1$  a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de albumina de soro bovino (BSA) [140-142], a qual desempenha um papel importante na regulação da pressão osmótica no sangue. Esta proteína é uma molécula bastante grande ( $66.382 \text{ Da}$ ) constituída de  $582$  aminoácidos (sequência conhecida) e três domínios, incluindo  $17$  pontes de dissulfetos que estão protegidos em  $\text{pH } 7,00$  [142]. Esta proteína é caracterizada pelo baixo número de triptofano e metionina, alto número de cisteína e aminoácidos carregados, asparina (ácido aspártico) e ácido glutâmico, lisina e arginina [143,144]

Outros constituintes importantes do leite são os macronutrientes cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fosforo (P), entretanto, o zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre

(Cu), são microelementos essenciais e estão presentes na estrutura de um grande número de moléculas, como as proteínas e enzimas, que desempenham diversas funções vitais no organismo humano [138,145].

Como exposto, devida à complexidade da matriz do leite, a determinação direta dos minerais (íons metálicos) por técnicas espectrométricas é uma tarefa difícil. Assim, é necessário realizar etapas de pré-tratamento do leite antes da quantificação dos íons metálicos. Nesse contexto, diversos métodos têm sido desenvolvidos para o preparo de amostras (matriz complexa) e acoplados a técnicas espectroanalíticas como a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS) para a determinação dos metais.

Frequentemente, o preparo da amostra de leite é realizado por meio da digestão ácida assistida por micro-ondas. Nessa digestão é utilizado o ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3$  - 65,0 %, m/v) como agente oxidante ou uma mistura de  $\text{HNO}_3$  e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  - 30,0% m/v) para formar o íon peroxinitrito ( $\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$ , Eq. 1), que possui um poder oxidativo mais eficiente da matéria orgânica quando comparado com o poder oxidativo individual do  $\text{HNO}_3$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  [146].



Belete e colaboradores [147] determinaram Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb em amostras de leite bovino provenientes de Borena (Etiópia), empregando a digestão ácida assistida por micro-ondas com detecção pela técnica F AAS. Nesse trabalho, os autores digeriram 3,0 mL da amostra com 6,0 mL de  $\text{HNO}_3$  (70,0%) e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30,0%). Após a digestão, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando o volume final com água deionizada. O método foi avaliado por meio do teste de adição/recuperação, obtendo porcentagens entre 92,5 e 100,0% apenas para Cr (0,845-0,895  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Mn (0,411-0,441  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Cu (0,087-0,122  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Zn (5,003-6,218  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), que correspondem aos metais detectados nas amostras de leite bovino.

Bizzi e colaboradores [148] avaliaram a influência da concentração do  $\text{HNO}_3$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na digestão de leite bovino integral e fígado bovino para determinação de metais por ICP OES (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn) e por ICP-MS (Cd, Co e Pb) com intuito de reduzir a quantidade de reagentes e tornar o método de digestão ácida via micro-ondas mais viável econômica e ambientalmente. Para isto, os autores avaliaram o conteúdo de carbono residual (%CCR) e acidez residual (%AR) após a digestão das duas amostras utilizando diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3$  (0,50, 0,75, 1,00, 1,50 e 2,00 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,00, 1,60, 3,30, 4,10, 4,90 e 6,50 mol  $\text{L}^{-1}$ ). Os autores observaram que maiores %CCR e %AR foram obtidos com menor concentração de  $\text{HNO}_3$  (0,50 e 0,75 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4,90 e 6,50 mol  $\text{L}^{-1}$ ). No entanto, com o aumento da concentração do  $\text{HNO}_3$  (2,00 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e na presença de 4,90 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foram obtidos menor %CCR e %AR, que são condições favoráveis para a determinação de metais pelas técnicas espectroanalíticas. Assim, os autores adotaram a mistura de 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e 4,90 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a digestão de leite bovino integral, e 1,50 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e 4,10 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a digestão de fígado bovino, obtendo concentrações confiáveis, uma vez que o método foi exato quando aplicado nos materiais de referência certificados NIST 1549 Non-Fat milk powder e NIST 1577 bobine liver.

Marques e colaboradores [149] empregaram a digestão ácida em fluxo assistida por micro-ondas de alta pressão para determinar metais em leite bovino e suco por ICP OES. Para a digestão das amostras, os autores utilizaram diferentes concentrações de ácido nítrico e misturas com HCl e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como descrito a seguir: (1) 3,70 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ , (2) 3,70 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  e 0,30 mol  $\text{L}^{-1}$  HCl, (3) 3,70 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  e 0,30 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (4) 9,30 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  e 0,80 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Porém, antes de submeter as amostras a digestão, as emulsões obtidas em meio ácido foram estabilizadas com: (1) sem estabilizante, (2) 50,0  $\mu\text{L}$  de 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  de EDTA, (3) 50,0  $\mu\text{L}$  de 10,0% m/m *Triton X-100*, (4) 50,0  $\mu\text{L}$  de 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  de EDTA e 50,0  $\mu\text{L}$  de 10,0% m/m *Triton X-100*; e em seguida sonicadas. Desta forma, os autores avaliaram o efeito do estabilizante, o tempo de sonicação e a temperatura na homogeneidade da emulsão antes de ser submetida a digestão. Assim, os autores concluíram que todas as emulsões mostraram ser estáveis na presença dos estabilizadores EDTA, *Triton X-100* e EDTA/*Triton X-100* até 20,0 min após a sonicação por 1,0 min, e a melhor condição para a digestão de suco de maçã e manga foi obtida com a mistura de 3,70 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e 0,30 mol  $\text{L}^{-1}$  de HCl, obtendo conteúdo de carbono residual (%CCR)

de 16,0 e 29,0%, respectivamente. Para as amostras de leite desnatado e integral, foram obtidos %CCR de 23,0 e 25,0% empregando  $10,50 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ , respectivamente. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com a digestão ácida convencional assistida por micro-ondas em frasco de Teflon fechado, em que não foi observada diferença significativa entre os resultados com nível de confiança de 95,0%.

Além da digestão ácida como método de preparo para a determinação de metais em amostras de leite, Stürup e Büchert [150] desenvolveram um método em meio básico para a quantificar Cu e iodo em amostras de leite bovino cru e em pó por injeção em fluxo acoplado a ICP-MS. Para isto, a amostra de leite (0,5 mL de leite cru ou 0,2 g de leite em pó) foi diluída com 9,5 mL ou 50,0 mL, respectivamente, de uma solução contendo  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de KOH e  $0,07 \text{ mol L}^{-1}$  de TMHA (Hidróxido de tetrametilamônio), em que as concentrações do KOH e TMHA foram otimizadas usando um planejamento fatorial completo  $2^3$ . Para realizar a análise de iodo, foi necessário diluir a amostra em uma solução alcalina (NaOH, KOH e  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), a fim de manter o iodo como iodeto. No entanto, foi escolhido o KOH, uma vez que o  $\text{NH}_4\text{OH}$  e NaOH podem formar o complexo  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_n]^{2+}$  e a espécie  $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ , respectivamente, interferindo na determinação do Cu. Com base nos resultados, os autores encontraram uma concentração média de  $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu e  $0,084 \text{ mg kg}^{-1}$  de I nas amostras de leite. A exatidão do método foi avaliada com os materiais de referência certificados CRM 063R, CRM 063, CRM 150 e SRM 1549.

Nessa mesma abordagem, mantendo-se a determinação em meio básico, Nóbrega e colaboradores [151] empregaram uma mistura de aminas ternárias solúveis em água (CFA-C) contendo EDTA para análise direta de Ca, K, Mg, Na, P, Zn, Al, Ba, Cu, I, Mn, Mo, Pb, Rb, Se e Sr em amostras de leite em pó, desnatado e integral. Neste caso, as amostras foram diluídas 10 vezes com CFA-C 10,0% v/v (pH = 8,00), obtendo suspensões límpidas e incolores que foram injetadas no ICP OES ou ICP-MS. A função da mistura CFA-C foi dissociar parcial ou totalmente as micelas da caseína, para liberar e estabilizar os cátions na fase líquida. Os autores comparam os resultados do método proposto (CFA-C) com os obtidos pelo método de digestão ácida (HPA, *high-pressure, high-temperature*), em que os resultados não apresentaram diferença significativa com nível de 95,0% de confiança. O método foi validado por meio dos materiais de referência certificados SRM 1549 (leite em pó sem gordura) e SRM 8435 (leite em pó integral).

Nascente e colaboradores [28] determinaram Cu e Zn em suco de fruta e leite bovino por espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS). Na determinação de Cu em leite bovino foi utilizada a mistura de CFA-C 10,0% (v/v), para promover o aumento da concentração do Cu na fase aquosa, bem como para evitar o rápido acúmulo de resíduo de carbono na ponta do capilar. Os autores encontraram  $161,7 \pm 6,5$  e  $153,1 \pm 2,4 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu e  $3,92 \pm 0,22$  e  $3,69 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinco em duas amostras de leite bovino, respectivamente, concluindo que as determinações de Cu e Zn nas amostras citadas foram viáveis devido aos baixos limites de detecção obtidos no TS-FF-AA e à reduzida diluição das amostras.

Pereira e colaboradores [152] determinaram Ca, Mg, Mn, e Zn em amostras de leite de búfala com detecção por F AAS empregando a mistura CFA-C. Os autores estudaram o fator de diluição mínimo das amostras, com CFA-C 10,0% v/v, para evitar problemas na injeção direta no nebulizador. O fator de 10 vezes foi adotado para a determinação de Zn, em quanto, para Ca, Mg e Mn foi necessário aumentar o fator de diluição, devido à maior concentração de esses íons no leite de búfala. A exatidão dos resultados analíticos obtidos com o procedimento CFA-C foi confirmada aplicando o teste t-Student pareado com nível de confiança de 95,0% comparado com o procedimento convencional de digestão ácida. Os autores concluem que o método proposto diminuiu acentuadamente o tempo requerido no preparo de amostras e que a introdução direta da amostra evitou perdas do analito.

Por outro lado, alguns métodos de pré-concentração também têm sido empregados para a determinação de íons metálicos em amostras de leite bovino. Dentre eles encontram-se a extração por ponto nuvem (CPE) [29] e extração em fase sólida (SPE) [11,30-32]. No entanto, a SPE tem sido considerada como a mais popular devido à simples operação, baixo consumo de solvente, fácil combinação com diferentes técnicas de detecção, bem como pela ampla gama de materiais que podem ser usados como adsorventes. Além disso, pode ser facilmente acoplada à análise por injeção em fluxo (FIA) para pré-concentração *on-line* do íon metálico, o que permite a fácil regeneração e reutilização da fase sólida, baixo volume de amostra, facilidade de automação e maior frequência analítica [33]. A extração SPE constitui na separação sólido-líquido e consiste na remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos.

Abollino e colaboradores [22] utilizaram duas microcolunas, uma recheada com a resina AG-1 X-8 e a outra com Chelex-100 para a especiação de Cu e Mn em amostras de leite bovino com detecção por ICP OES. Inicialmente, as amostras foram diluídas dez vezes com tampão ácido acético/acetato de sódio e o pH foi ajustado a 4,83, que corresponde ao ponto isoelétrico da caseína. Nessa condição, os autores obtiveram precipitação da caseína junto com a co-precipitação de outras macromoléculas (lipídios). Depois, as amostras foram filtradas utilizando uma membrana de celulose (3,0  $\mu\text{m}$ ), obtendo soluções límpidas que foram percoladas pelas microcolunas, sem risco de entupimento, para a quantificação do Cu e Mn livre ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ). Além disso, o Cu e Mn foi quantificado no precipitado para conhecer a fração complexada com caseína. Finalmente, a concentração total do Cu e Mn nas amostras foi determinada por GF AAS. Os autores concluem que a distribuição iônica e complexada dos dois metais é diferente. O Cu encontra-se no leite 40,8% ( $9,5 \pm 2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em estado livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e 53,7% ( $12,5 \pm 2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ligado à caseína. A outra porcentagem (5,5%) foi reportada como valor incerto (1,6%,  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e como não retida nas microcolunas (3,9%,  $0,9 \pm 5,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No caso do Mn, este metal encontra-se 47,7% ( $12,4 \pm 1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) na forma livre ( $\text{Mn}^{2+}$ ), 10,8% ( $2,8 \pm 2,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) forma aniônica, 10,4% ( $2,7 \pm 4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ligado à caseína, 25,8% ( $6,7 \pm 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) não retido e 5,3% ( $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) como valor incerto. No entanto, as resinas AG-1 X-8 e Chelex-100 possuem baixa reusabilidade e são susceptíveis a efeito de interferência, por não serem seletivas.

Atualmente, existem diversos métodos baseados na extração de fase sólida para a pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  presentes em amostras de leite bovino [11,30-32]. No entanto, as amostras são submetidas a digestão ácida assistida por micro-ondas antes da etapa de pré-concentração.

### 3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral sintetizar e caracterizar polímeros ionicamente impressos (IIP) na ausência e presença dos modificadores de superfície 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e albumina de soro bovino (BSA), para avaliar o desempenho analítico destes polímeros na pré-concentração e determinação *on-line* de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com simultânea exclusão de proteínas, utilizando análise de injeção em fluxo acoplada a espectrometria de absorção atômica com chama (FIA-F AAS), visando a aplicação do método em amostras de leite.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os IIP pela técnica de polimerização em “bulk” utilizando os solventes porogênicos acetonitrila (ACN) ou etanol (EtOH);
- Modificar a superfície dos IIP com HEMA e BSA, como meios de acesso restrito;
- Preparar os respectivos polímeros controle (não impressos) para avaliar o efeito de impressão química;
- Avaliar o efeito dos modificadores HEMA e BSA, bem como o efeito do solvente porogênico sobre as propriedades morfológicas, texturais, adsorptivas e seletivas dos IIP;
- Selecionar o polímero com melhor desempenho na exclusão de BSA e simultânea pré-concentração de cobre para o desenvolvimento do método analítico;
- Otimizar o método de pré-concentração/determinação *on-line* de  $\text{Cu}^{2+}$  em sistema FIA-F AAS empregando planejamento fatorial;
- Determinar os parâmetros analíticos do método de pré-concentração/determinação *on-line* de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , na ausência e presença de BSA.
- Determinar a capacidade máxima de adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em condições dinâmicas por meio de curvas de ruptura na ausência e presença de BSA.
- Avaliar o efeito de interferência de íons potencialmente competitivos na pré-concentração/determinação *on-line* de íons  $\text{Cu}^{2+}$ .
- Determinar a concentração de cobre total em amostras de leite bovino e de soja pelo método proposto e comparar os resultados com o método de digestão ácida assistida por forno micro-ondas com determinação por GF AAS.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes empregados na síntese dos polímeros foram: nitrato de Cu [ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 98,0-103,0%], alitiourea (ATU, 98,0%), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, 98,0%), 2,2'-azobis-iso-butironitrila (AIBN, 98,0%); Albumina de soro bovino em pó (BSA, 98,0%), glutaraldeído (25,0% em água); borohidreto de sódio (98,0%), acetonitrila (ACN, 99,0%), adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); 2-hidroxietil metacrilato (HEMA, 98,0%) da Acros Organic (Morris Plains, NJ, EUA); álcool etílico (EtOH, 99,0%) da marca Synth (Diadema, SP, BR).

A solução de trabalho de  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  preparada a partir do sal de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em HCl 5,0% (v/v). As soluções tampão acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ ), fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ), Tris-HCl (Tris/Tris-HCl) e amônia ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) foram preparadas a partir dos sais de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 99,0%) da Vetec, (Rio de Janeiro, RJ, BR), dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 98,0%) e cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100,3%) da marca J.T.Baker (Ecatepec, Estado de México, México), e cloridrato de tris(hidroximetil) aminometano [ $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$ ] da Merck (Darmstadt, Alemanha).

As soluções padrão de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e citrato de concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  utilizadas no estudo de seletividade e interferentes foram preparadas a partir dos sais de nitrato de cádmio (II) tetra hidratado (Vetec, 99,0%), nitrato de cobalto (II) hexa hidratado (Vetec, 98,0-102,0%), cloreto de ferro (II) (Sigma-Aldrich, 98,0%), nitrato de níquel (II) hexa hidratado (Sigma-Aldrich, 99,0%), nitrato de chumbo (II) (Vetec, 99,0%), nitrato de zinco (II) hexa hidratado (Vetec, 98,0%), nitrato férrico (Vetec, 99,0%), nitrato de alumínio (Nuclear, 99,0%), nitrato de cálcio tetra hidratado (Nuclear, 97,0%), nitrato de magnésio hexa hidratado (Vetec, 99,0%), cloreto de potássio (Química moderna, 99,0-100,0%), nitrato de sódio (Nuclear, 98,0%), cloreto de sódio (Química Moderna, 99,0%) e citrato de sódio (Chemco, 99,0%), respectivamente.

Todas as soluções utilizadas neste estudo foram preparadas com água purificada proveniente do sistema ELGA PURELAB Máxima (High Wycombe, Bucks, UK.), resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico PA. Para evitar contaminação das soluções e amostras, as vidrarias de laboratório e os

plásticos foram mantidos em banho de ácido nítrico 10,0% (v/v) por 24 h e depois lavadas com água deionizada antes de usar.

O pH das soluções e amostras foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH, Vetec, 99,0%), hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH, Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil, 24,0-26,0%) e/ou ácido clorídrico (HCl, Panreac, Darmstadt, Alemanha, 37,0 %). As soluções de 1,00, 1,50 e 2,00 mol L<sup>-1</sup> de HCl, utilizadas na etapa de eluição, foram preparadas por diluição de ácido clorídrico concentrado.

#### 4.2 SÍNTESE DO IIP E IIP-RAM

Diversos IIP tem sido sintetizados em nosso grupo de pesquisa utilizando monômeros funcionais para retenção de diferentes metais, tais como: acrilamida/Cu<sup>2+</sup> [79,153], ácido metacrílico na presença do complexante auxiliar 1-(2-piridilazo)-2-naftol/Pb<sup>2+</sup> [154], 1-vinilimidazol/Zn<sup>2+</sup> [155], ácido metacrílico/Ni<sup>2+</sup> [156], cujos átomos doadores de elétrons são nitrogênio e oxigênio. De acordo com estudos reportados na literatura, o átomo de enxofre presente na estrutura dos tiolatos (base mole) apresenta alta afinidade pelos íons Cu<sup>2+</sup> (ácido intermediário), segundo a teoria de classificação de Pearson em ácido-base duros e moles dos íons metálicos e ligantes [4,5,100]. Desta forma, com o intuito de explorar outros monômeros e baseados em trabalhos publicados, a aliltioureia (ATU) foi utilizada como monômero vinilado para formar o complexo de Cu polimerizável [95,99,157,158].

Os polímeros foram sintetizados pela técnica de reação de polimerização em massa ("bulk"). Inicialmente, para a síntese do polímero (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(ACN)</sub>, 0,5 mmol (0,1208 g) de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O (*template*) foram dissolvidos em 10,0 mL de ACN. Na sequência, foram adicionados 5,0 mmol (0,5927 g) do monômero ATU previamente dissolvidos em 5,0 mL de ACN. A mistura foi agitada manualmente por 5,0 min. Em seguida, foram adicionados ao meio reacional 20,0 mmol (3,8 mL) do agente reticulante EGDMA [159] e 0,6 mmol (0,1020 g) do iniciador radicalar 2,2'-azoisobutironitrila (AIBN). Na solução obtida foi borbulhado gás nitrogênio por 5,0 min. O frasco reacional foi lacrado e a solução polimerizada a 60 °C em banho de óleo por 24 h. Finalmente, o polímero foi lavado com água ultrapura, seco em estufa, triturado com almofariz e pistilo, e peneirado para obter um tamanho de partículas entre 106-150 µm.

Para a síntese do polímero com modificação de superfície usando o comonômero HEMA [(Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] seguiu-se o mesmo procedimento descrito

anteriormente, adicionando 5,0 mmol (600,0  $\mu\text{L}$ ) do HEMA [66], após a formação do complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -ATU.

Uma porção do polímero  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> foi lavado, seco e com tamanho de partícula entre 106-150  $\mu\text{m}$ , foi utilizada para imobilizar BSA sobre sua superfície, seguindo-se o procedimento descrito por Moraes e colaboradores [56]. Para tanto, 20,0 mL de uma solução BSA 1,0% (m/v) preparada em tampão fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ), 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 6,00 foram percolados através de uma minicoluna cilíndrica de plástico contendo 500,0 mg do  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> na vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Após 20,0 min, foram percolados 5,0 mL de uma solução de glutaraldeído 25,0% (v/v) e a minicoluna foi deixada em repouso por 5 h a 25 °C. Depois, 10,0 mL de borohidreto de sódio 1,0% (m/v) foram percolados pela minicoluna na vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Finalmente, após 2 h o  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> obtido foi lavado com água ultrapura durante 30,0 min a 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . O polímero foi mantido sob refrigeração (4 °C), sendo retirado apenas no momento de uso na pré-concentração.

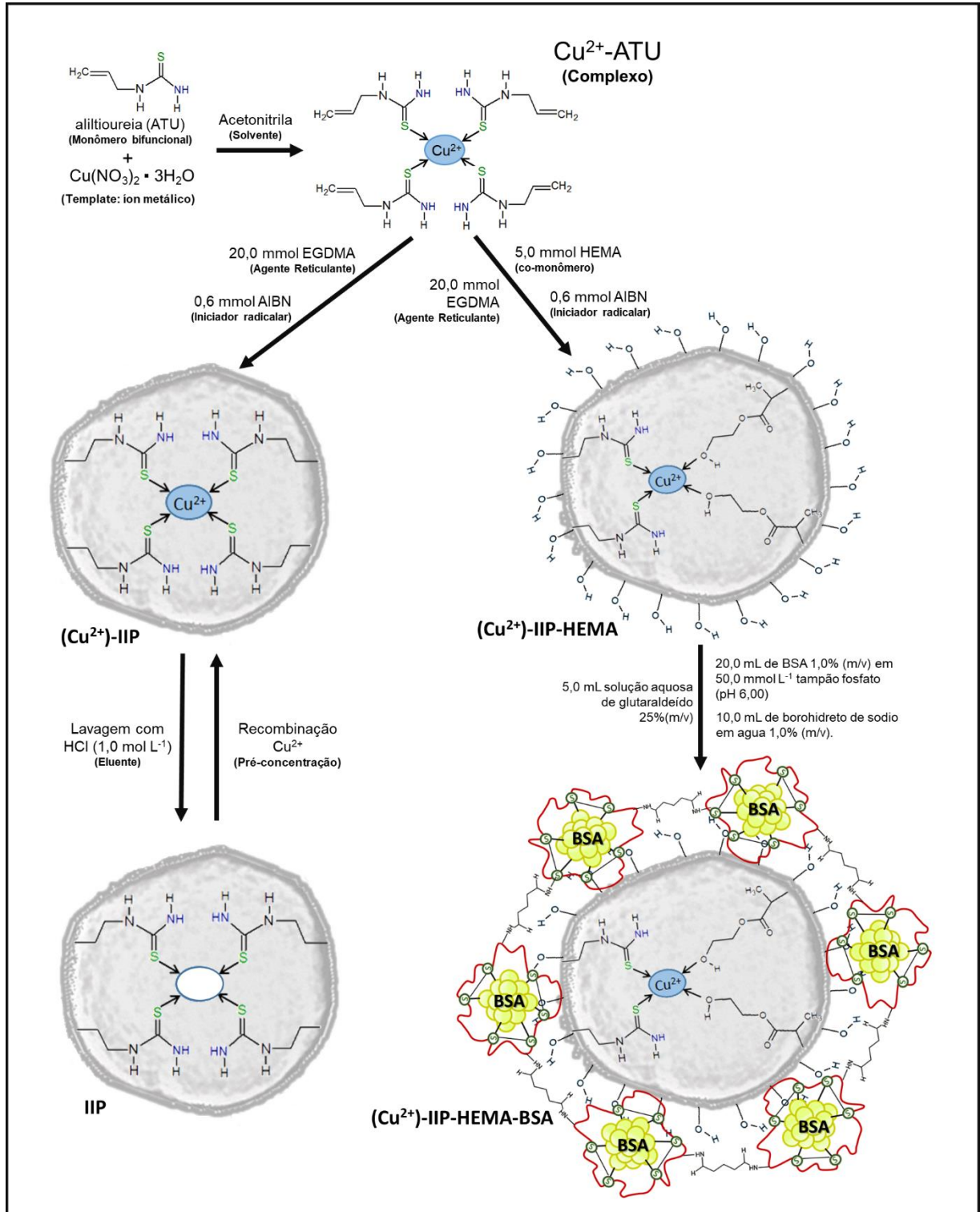
A representação esquemática da síntese e estrutura dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(ACN)</sub>,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> esta apresentada na Figura 16.

Os polímeros descritos anteriormente também foram sintetizados em EtOH:  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(EtOH)</sub>,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub> e  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>, para avaliar o efeito do solvente no tamanho e na forma das partículas poliméricas, e a influência destas propriedades na pré-concentração de Cu e exclusão de proteína.

Finalmente, foram sintetizados os polímeros não impressos (polímeros controle), denominados NIP<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, com intuito de avaliar o efeito da impressão química. Porém, os polímeros NIP<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> foram usados apenas no estudo de seletividade e na análise elementar.

Alguns estudos deste trabalho foram realizados com e sem a remoção (lavagem) do íon  $\text{Cu}^{2+}$  da matriz polimérica, em que, os polímeros lavados (sem íons  $\text{Cu}^{2+}$ ) foram denominados IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA.

**Figura 16.** Representação esquemática do processo da síntese e estrutura dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ .



Fonte: o próprio autor.

No Quadro 6 se apresentam de forma geral os polímeros sintetizados neste estudo.

**Quadro 6.** Descrição geral dos polímeros sintetizados neste estudo

Polímero	Solvente Porogênico	Meios de Acesso Restrito (RAM)	Descrição Geral
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP <sub>(ACN)</sub>	ACN	Não possui RAM	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP<sub>(ACN)</sub></b> .
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP <sub>(EtOH)</sub>	EtOH	Não possui RAM	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP<sub>(EtOH)</sub></b> .
NIP <sub>(ACN)</sub>	ACN	Não possui RAM	Polímero não impresso, não contém Cu <sup>2+</sup> .
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	ACN	Modificado com HEMA	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub></b> .
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA <sub>(EtOH)</sub>	EtOH	Modificado com HEMA	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub></b> .
NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	ACN	Modificado com HEMA	Polímero não impresso, não contém Cu <sup>2+</sup> .
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub>	ACN	Modificado com HEMA e BSA	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub></b> .
(Cu <sup>2+</sup> )-IIP-HEMA-BSA <sub>(EtOH)</sub>	EtOH	Modificado com HEMA e BSA	Polímero impresso com Cu <sup>2+</sup> . Ao remover o Cu da matriz polimérica foi denominado <b>IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub></b> .
NIP-HEMA-BSA <sub>(ACN)</sub>	ACN	Modificado com HEMA e BSA	Polímero não impresso, não contém Cu <sup>2+</sup> .

ACN: Acetonitrila; EtOH: Etanol; HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; BSA: albumina de soro bovino.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS E INSTRUMENTAÇÃO

Os polímeros impressos saturados com Cu [(Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub>] junto com os polímeros lavados [IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e IIP-HEMA-BSA] e o polímero controle [NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>] foram caracterizados empregando algumas técnicas instrumentais e metodologias de análise, para compreender diferentes aspectos relacionados à composição, estrutura química, morfologia, textura, entre outras, destes materiais.

##### 4.3.1 Espectroscopia FT-IR.

Os grupos funcionais presentes nos polímeros foram identificados mediante a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) utilizando um espectrômetro FT-IR modelo Shimadzu 8300 operando no modo de transmissão entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>. 30,0 mg de brometo de potássio (KBr), da marca SIGMA-ALDRICH (99,0%) previamente seco e purificado em mufla a 600 °C por 22 h, foram misturadas rapidamente, com 1,00 mg de polímero (empregando um almofariz com pistilo), para evitar a absorção da água presente no ambiente, devido às características

higroscópicas do KBr. A mistura foi compactada uniaxialmente na forma de pastilhas (discos) com diâmetro de 13 mm utilizando um molde evacuável para pastilhamento (Evacuable KBr & Briquetting Pellet Dies) e uma prensa manual (marca Schulz Joinville, SC-BR), aplicando uma força de 4 tons por 1,0 min. Nesta técnica foi utilizado KBr devida à transparência deste sal quando é comprimido até aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de espessura [160].

#### 4.3.2 Análise Térmica

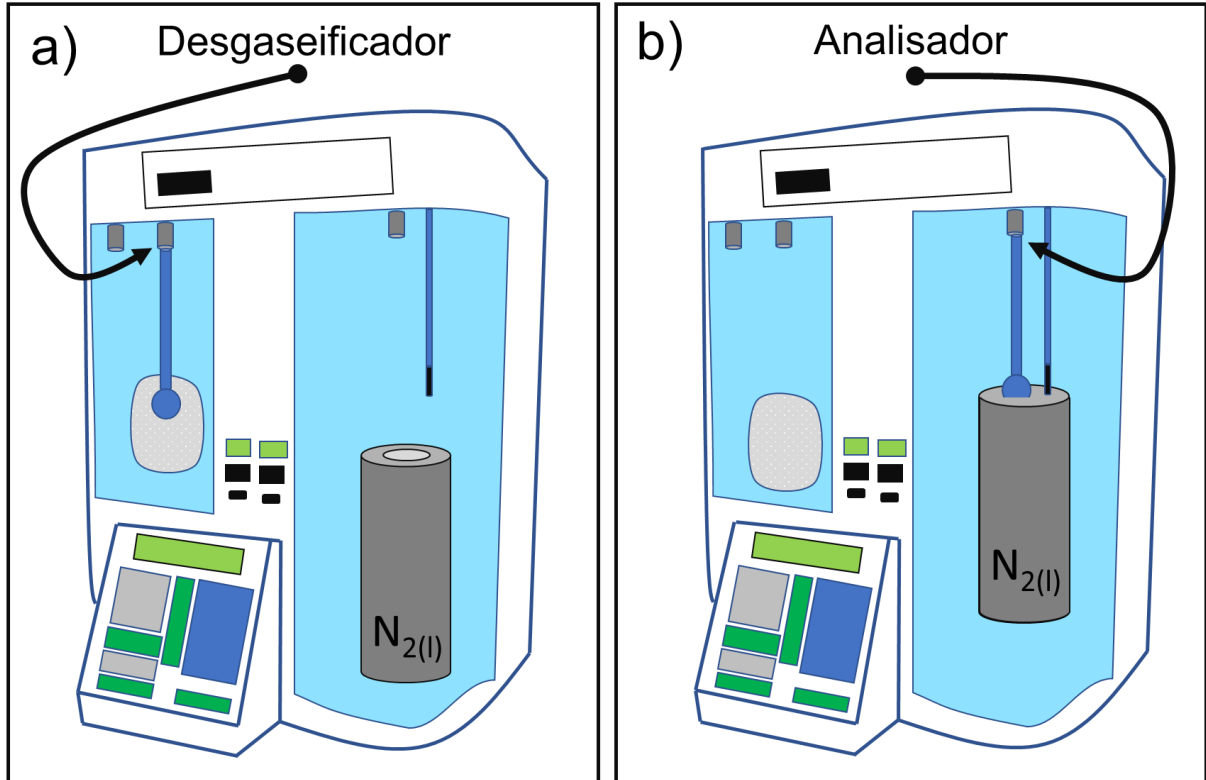
A análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric analysis*) foi realizada pelo aquecimento de aproximadamente 15,0 mg dos polímeros, de 30 °C até 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio, utilizando o equipamento PerkinElmer® TGA 4000 (Massachusetts, USA). Essa análise foi realizada para determinar a perda de massa em função da temperatura, obtendo informação relacionada sobre a interação dos reagentes com a rede polimérica, incluindo o *template* (Cu), e sua influência na estabilidade térmica dos materiais obtidos.

#### 4.3.3. Parâmetros Texturais por Fisissorção de Gás N<sub>2</sub>

Os parâmetros texturais dos polímeros, tal como a área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), o volume total de poros ( $V_{\text{TP}}$ ) e o diâmetro médio dos poros ( $D_{\text{MP}}$ ) foram calculados por meio de isotermas de adsorção-dessorção com gás nitrogênio a 77 K (-196 °C) e com pressões relativas entre  $\sim 10^{-6}$  a 0,995 mmHg, utilizando o equipamento Quantachrome® Nova 1200e acoplado a um analisador automático de gases (todos –Quantachrome, Boynton Beach, FL, EUA) (Figura 17).

Para este estudo, inicialmente foram pesadas 250,0 mg do polímero e introduzidas em um tubo de amostragem de vidro de 9,0 mm com bulbo. Depois, o tubo contendo o polímero foi colocado no desgaseificador do equipamento (Figura 17a) e foi deixado durante 4 h a 120 °C sob vácuo para eliminar a água adsorvida. Após, um bastão de vidro foi inserido dentro do tubo de amostragem para reduzir o volume total e em seguida o tubo foi colocado no analisador (Figura 17b) e imerso em banho de nitrogênio líquido (77 K) para realizar o estudo de adsorção com gás nitrogênio.

**Figura 17.** Representação geral dos componentes do equipamento Quantachrome® Nova 1200e: a) degaseificador e b) analisador.



**Fonte:** o próprio autor

As isotermas de adsorção-dessorção com gás nitrogênio foram construídas com 39 pontos, sendo 20 pontos de adsorção e 19 pontos de dessorção. A partir dessas isotermas foi calculada a área superficial específica ( $S_{BET}$ ), o volume total de poros ( $V_{TP}$ ) e o diâmetro médio dos poros ( $D_{MP}$ ). Cabe salientar que esses parâmetros foram calculados a partir da massa seca dos polímeros obtida após a remoção da água no degaseificador.

A  $S_{BET}$  foi determinada de acordo com a equação de Brunauer-Emmett-Teller (BET), que contempla a superposição de infinitas camadas moleculares (multicamada) e relaciona o volume total de gás adsorvido ( $v$ ) em função da pressão relativa ( $p/p_0$ ). A equação de BET na sua forma linear para adsorção de gás pode ser descrita como Eq. 2 [161]:

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{v \left[ 1 - \left( \frac{p}{p_0} \right) \right]} = \frac{c-1}{v_m c} \left( \frac{p}{p_0} \right) + \frac{1}{v_m c} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde  $v$  é o volume total de gás adsorvido,  $v_m$  é a capacidade de adsorção na monocamada, ou seja, a quantidade de gás necessária para formar a monocamada,

$p$  é a pressão parcial do gás no equilíbrio,  $p_0$  é a pressão de saturação e  $C$  é a constante BET.

A inclinação  $[(C-1)/v_m C]$  e a interseção com o eixo  $y$  ( $1/v_m C$ ) da região linear da isoterma de adsorção podem fornecer a capacidade de adsorção na monocamada,  $v_m$ , e a partir desta é possível calcular área superficial específica BET ( $S_{BET}$ ), ou seja, a área específica ocupada pela monocamada, por meio da Eq. 3:

$$S_{BET} = \frac{v_m N_{AV} \sigma}{v_0 m} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde  $N_{AV}$  é a constante de Avogadro (número de moléculas por mol),  $\sigma$  é a área ocupada por uma molécula do gás adsorvido ( $16,2 \text{ \AA}^2$  para o nitrogênio),  $m$  é a massa do polímero usada na análise e  $v_0$  é  $22.400 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ , que representa o volume em condições padrão de temperatura e pressão (CPTP) de um mol de gás. A  $S_{BET}$  é dada em unidades de área/massa ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).

A distribuição de tamanhos ou de volumes de poro em função do diâmetro de poro foram estimados pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH), que é baseado na equação de Kelvin e assume o esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido com o decréscimo da pressão [162]. O método BJH é amplamente utilizado na determinação da distribuição do tamanho de poros em materiais mesoporos e uma pequena faixa dos macroporos. O volume total de poros ( $V_{TP}$ ) é determinado a partir da quantidade de vapor adsorvido a uma pressão relativa  $p/p_0 = 0,99$  (assumindo que os poros são preenchidos por condensação capilar) por meio da Eq. 4 [163]:

$$V_{TP} = \frac{p_a v_m v_{N_2}}{RT} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde  $V_{TP}$  é o volume de  $N_2$  líquido nos poros,  $p_a$  é a pressão ambiente,  $v_m$  é o volume de gás adsorvido,  $v_{N_2}$  é o volume molar de adsorvato líquido ( $N_2 = 34,7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura ambiente (K). O diâmetro médio dos poros ( $D_{MP}$ ) foi calculado usando a Eq. 5:

$$D_{MP} = \frac{4V_{TP}}{S_{BET}} \quad \text{Eq. (5)}$$

#### 4.3.4 Características Morfológicas e Composição Elementar Semiquantitativa

As características morfológicas dos polímeros foram avaliadas por um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Quanta-200 (Philips-FEI) equipado com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) nas ampliações de 70, 2000, 10000 e 30000 vezes, com escala de 1,0 mm, 50,0  $\mu\text{m}$ , 10,0  $\mu\text{m}$  e 2,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Para análise de MEV, os polímeros foram dispersos em uma fita dupla face e revestidos com uma fina camada de ouro (30 nm) utilizando o equipamento Bal-Tec SCD Sputter Coater (New York, EUA). A espectroscopia de energia dispersiva de Raios X (EDS) foi utilizada para proporcionar informações semiquantitativas com respeito à composição elementar e dispersão dos átomos de cobre (Cu), enxofre (S), carbono (C) e oxigênio (O) na superfície dos polímeros.

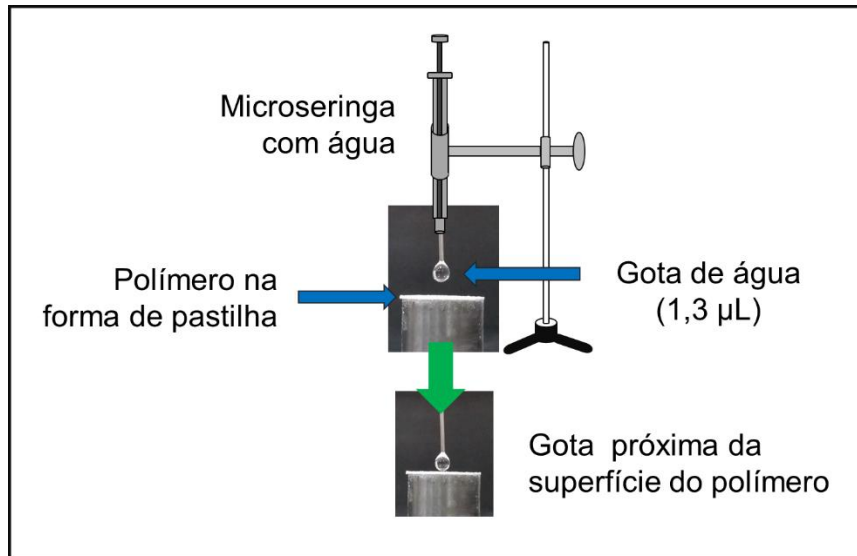
#### 4.3.5 Análise Elementar CHNS

A determinação das porcentagens de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S) nos polímeros foi realizada com o analisador elementar PerkinElmer 2400 series-II CHNS/O analyzer, utilizando L-cistina como padrão. Aproximadamente 2,0 mg de polímero foram colocadas no amostrador automático para realizar a combustão em atmosfera de oxigênio puro. Os gases resultantes dessa combustão foram quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica).

#### 4.3.6 Determinação da Molhabilidade dos Polímeros

O grau de molhabilidade da superfície dos polímeros foi determinado pelo método de gota séssil [164,165]. Para tanto, 30,0 mg de cada polímero foram compactadas uniaxialmente na forma de pastilhas (discos circulares) com diâmetro de 13 mm, utilizando um molde evacuável para pastilhamento (Evacuable KBr & Briquetting Pellet Dies) e uma prensa manual (marca Schulz Joinville, SC-BR), aplicando uma força de 2 Tons por 30 s para não modificar as propriedades mecânicas dos materiais. Após a obtenção das pastilhas, uma gota de água (1,3  $\mu\text{L}$ ) foi colocada na superfície dos polímeros com ajuda de uma microseringa, conforme apresentado na Figura 18. As imagens foram capturadas no plano transversal com uma câmera comum de 13 megapixels, colocada em um suporte metálico tripé.

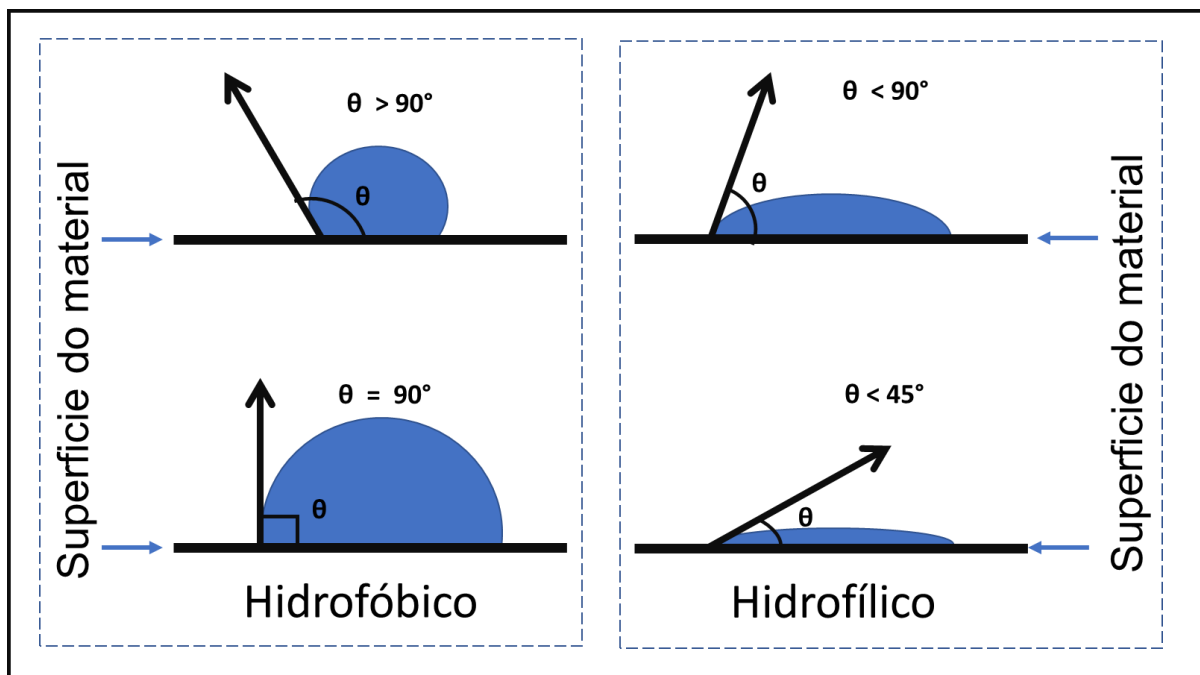
**Figura 18.** Representação do esquema montado para determinar o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos polímeros compactados na forma de pastilhas (discos), depositando 1,3  $\mu\text{L}$  de água na superfície desses materiais.



Fonte: o próprio autor.

De acordo com o comportamento da gota de água sobre a superfície dos polímeros os materiais sintetizados podem ser classificados em hidrofóbicos ou hidrofílicos, como pode ser observado no esquema apresentado na Figura 19.

**Figura 19.** Esquema de classificação de materiais sólidos em hidrofóbicos ou hidrofílicos com base na magnitude do ângulo de contato entre a gota de água e a superfície plana do sólido.



Fonte: o próprio autor

#### 4.3.7 Efeito *Swelling*

O efeito *swelling* (inchamento) foi realizado para avaliar a hidrofilicidade dos polímeros sintetizados por meio da absorção de água, como um estudo complementar da molhabilidade [64,166]. Para este experimento 100,0 mg de polímero foram agitadas com 10,0 mL de água ultrapura por 24 h. Após esse tempo, os polímeros foram filtrados em membranas de Nylon® (marca Magna, 0,45 µm) sob vácuo e pesados em balança analítica (marca Shimadzu modelo AUX220). As massas iniciais (massa seca) e finais (massa úmida) dos materiais foram utilizadas para calcular o Teor de Água de Equilíbrio (TAE) por meio pela Eq. 6.

$$TAE (\%) = \frac{(Massa_{(úmida)} - Massa_{(seca)})}{Massa_{(seca)}} \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

O valor reportado para este estudo corresponde à média de n=3 com seu respectivo desvio padrão (DP).

#### 4.3.8 Ponto de Carga Zero (PCZ)

Neste estudo, 50,0 mg de polímero foram pesadas e adicionadas em tubos falcon (50,0 mL). Aos tubos foram adicionados 25,0 mL de uma solução de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH, na faixa de 3,00 a 13,00, ajustado com HCl e NaOH (0,10 mol L<sup>-1</sup>). Os tubos foram agitados por 24 h e, após este tempo, o pH foi novamente registrado. A quantidade de íons H<sup>+</sup> ou HO<sup>-</sup> adsorvidos pelos polímeros foi calculada a partir da diferença entre o pH inicial e final da solução de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> [167,168]. As medidas de pH foram realizadas utilizando o pHmetro Metrohm® 827 pH lab. O valor reportado para este estudo corresponde à média de n=3 com seu respectivo desvio padrão (DP).

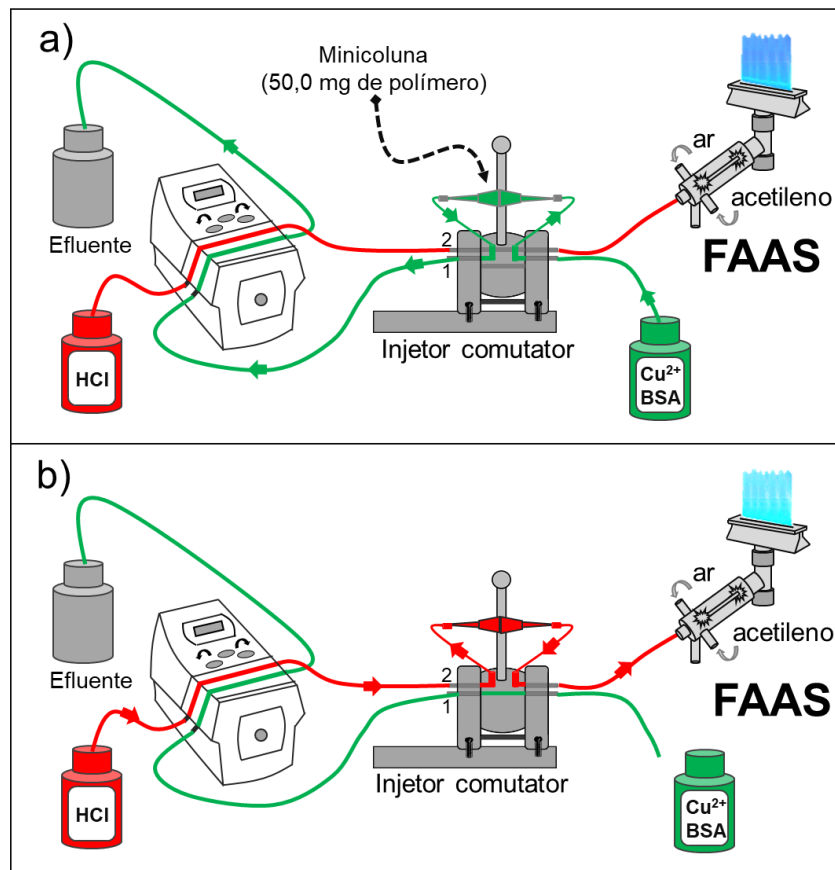
#### 4.4 SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu<sup>2+</sup>

A determinação de Cu foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica com chama - F AAS (Shimadzu AA-7000, Tóquio, Japão) equipado com lâmpada de cátodo oco e lâmpada de deutério para correção de fundo. A lâmpada de cátodo oco de Cu foi operada em corrente de 8,0 mA e comprimento de onda de 324,8 nm. A chama foi composta pela mistura de acetileno/ar, operando em vazão de 1,8 L min<sup>-1</sup> e 15,0 L min<sup>-1</sup>, respectivamente.

O sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção por F AAS foi configurado em duas etapas como é mostrado na Figura 20. O sistema FIA foi constituído por um injetor comutador de acrílico, acoplado ao F AAS, e por uma bomba peristáltica GILSON Minipuls Evolution (Middleton, Wi, EUA), equipada com tubos Tygon® para propulsionar as amostras e os reagentes para o sistema de detecção. Foram utilizados tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno para conectar o injetor com os tubos Tygon® e o F AAS.

Para o sistema de pré-concentração, 50,0 mg de cada polímero foram inseridas separadamente em minicolunas cilíndricas, construídas a partir de secções de ponteiros de micropipeta (1,5 cm de comprimento com diâmetro interno de 5,0 mm). Nas extremidades da minicoluna foi colocado tecido de algodão como material filtrante, com o intuito de evitar a perda do material adsorvente durante o processo de pré-concentração e eluição [169]. As minicolunas foram conectadas alternadamente ao injetor comutador para determinação *on-line* do Cu.

**Figura 20.** Sistema de pré-concentração e eluição em fluxo de  $\text{Cu}^{2+}$ : a) etapa de pré-concentração, posição da minicoluna na linha 1; b) etapa de eluição, posição da minicoluna na linha 2.



Fonte: o próprio autor.

#### 4.5 EFEITO DO pH NA ADSORÇÃO DE ÍONS $\text{Cu}^{2+}$

Foi estudado o efeito do pH na adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  pelos polímeros IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo com pré-concentração *on-line* descrita anteriormente.

Inicialmente, a etapa de pré-concentração do íon  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 20a) foi realizada percolando pelas minicolunas 20,0 mL de uma solução de 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes valores de pH (entre 4,00 e 11,50) na ausência e presença de tampão 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 4,00 e 5,75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 6,50 =  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , pH = 7,45 - 9,40 = Tris/Tris-HCl, pH 10,50 e 11,50 =  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ), na vazão de 5,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Depois, a eluição dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  adsorvidos nos polímeros foi realizada com HCl 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$  comutando o injetor para a posição 2 (Figura 20b).

É importante salientar que, após a eluição dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ , provenientes da solução na ausência de tampão, 20,0 mL de água ultrapura foram percolados pela minicoluna na vazão de 5,0 mL  $\text{min}^{-1}$  para reduzir o excesso de acidez da minicoluna ocasionado pelo eluente (HCl), evitando a variação do pH da seguinte solução (na ausência de tampão) a ser pré-concentrada.

A pré-concentração foi realizada no sentido contrário à eluição para evitar a criação de caminhos preferenciais dentro da minicoluna. O valor médio das absorvâncias (altura de pico) (n=3) foi utilizado como sinal analítico nas análises, reportado com seu respectivo desvio padrão (DP).

#### 4.6 ESTUDO DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNA

A albumina de soro bovino (BSA) foi escolhida como macromolécula para o estudo de exclusão de proteína na concentração de 0,5 g  $\text{L}^{-1}$ , que é a concentração comumente encontrada no leite bovino [140-142]. Assim, este estudo foi realizado seguindo o mesmo processo descrito na adsorção do  $\text{Cu}^{2+}$ , 20,0 mL de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de BSA 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  em pH 4,75, 7,45 e 9,40 com tampão e sem tampão 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 4,75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 7,45 - 9,40 = Tris/Tris-HCl) foram percolados, de forma alternada, pelas minicolunas (Figura 20a). Depois, a eluição de íons Cu foi realizada com HCl 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$  (Figura 20b). Finalmente, uma solução de NaCl 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$  foi percolada pelas minicolunas para remover a BSA remanescente. O valor reportado para este estudo corresponde à média de n = 3 com seu respectivo desvio padrão (DP).

O efluente da etapa de pré-concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA foi coletado e analisado por UV-Vis a  $\lambda_{\text{max}}$  278 nm (absorção de Tirosina e Triptofano) para monitorar a concentração inicial e final da proteína BSA após a pré-concentração do Cu. A porcentagem de exclusão foi calculada pela razão entre a absorbância do efluente e a absorbância da solução inicial, e o resultado obtido foi multiplicado por 100.

A determinação da concentração de BSA foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis PerkinElmer® Lambda 25 (Massachusetts, EUA) na região do ultravioleta de 250 a 350 nm.

#### 4.7 ESTUDO DE SELETIVIDADE

A seletividade dos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> pelo íon  $\text{Cu}^{2+}$  (raio iônico: 71,0 pm) na presença de íons potencialmente competitivos, tais como  $\text{Cd}^{2+}$  (raio iônico: 109,0 pm),  $\text{Co}^{2+}$  (raio iônico: 88,5 pm),  $\text{Fe}^{2+}$  (raio iônico: 92,0 pm),  $\text{Ni}^{2+}$  (raio iônico: 83,0 pm),  $\text{Pb}^{2+}$  (raio iônico : 133,0 pm) e  $\text{Zn}^{2+}$  (raio iônico: 88,0 pm) foi realizada em batelada a temperatura ambiente, utilizando soluções binárias. Estes íons (ácidos intermediários e moles) foram escolhidos por apresentar carga (2+), tamanho similar e habilidade para interagir com átomos de enxofre (bases moles) presente na estrutura da ATU. A mistura de 50,0 mg de polímero e 25,0 mL da solução binária ( $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ), ambos íons na concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  na ausência de tampão em pH 4,50, foi agitada durante 40,0 min, centrifugada e o sobrenadante foi removido para análise direta no F AAS. Os coeficientes de distribuição ( $K_d$ ), de seletividade ( $k$ ) e de seletividade relativa ( $k'$ ) foram calculados com as Eq. 7 - 10.

$$K_d = \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \frac{V}{m} \quad \text{Eq. (7)}$$

Em que  $C_i$  corresponde à concentração inicial do íon  $\text{Cu}^{2+}$  e dos íons competitivos na solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ), e  $C_f$  é a concentração final do íon  $\text{Cu}^{2+}$  e dos íons competitivos no sobrenadante,  $V$  é o volume (25,0 mL) e  $m$  é a massa do polímero.

$$k_{\text{Polímero Impresso}} = \frac{K_d (\text{Cu}^{2+})}{K_d (\text{íon competitivo})} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$k_{\text{Polímero Não Impresso}} = \frac{K_d (\text{Cu}^{2+})}{K_d (\text{íon competitivo})} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$k' = \frac{k_{\text{Polímero Impresso}}}{k_{\text{Polímero Não Impresso}}} \quad \text{Eq. (10)}$$

O valor reportado para este estudo corresponde à média de n= 3.

#### 4.8 OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS $\text{Cu}^{2+}$ EM SISTEMA FIA-F AAS POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA.

A eficiência da pré-concentração em sistema FIA para íons metálicos depende da adequada otimização de alguns fatores tais como: vazão de pré-concentração e eluição, tipo e concentração de eluente, volume, pH e massa da mostra, assim como de seus respectivos níveis. Desta forma, as otimizações destes fatores junto com o efeito de suas interações podem ser adequadamente feitas por meio da análise multivariada empregando planejamento fatorial completo ou fracionado.

Neste estudo, as condições ótimas do método proposto foram definidas empregando a análise multivariada para observar o efeito principal dos fatores (variáveis independentes) e o efeito de suas interações sobre o sinal de absorvância (altura do pico) e a eficiência de sensibilidade (ES), como respostas obtidas durante a etapa de pré-concentração do íon  $\text{Cu}^{2+}$  em sistema FIA-F AAS. Desta forma, foi realizado um planejamento fatorial completo com dois níveis e três fatores ( $2^3$ ) obtendo 8 ensaios mais o ponto central em triplicata, todos realizados de forma aleatória para evitar possíveis erros sistemáticos. Os fatores estudados foram: massa do polímero (MP), vazão de pré-concentração (VP) e concentração do eluente HCl (CE). Estes fatores, assim como seus níveis, foram previamente determinados com base na literatura e estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa [154-156,170,171].

A eficiência de sensibilidade (ES) foi obtida pela razão entre a absorvância e o tempo requerido, em segundos, na etapa de pré-concentração.

Todos os experimentos foram realizados conforme descrito na sessão 3.3, percolando 20,0 mL de solução contendo  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 4,50 na ausência de tampão. Os dados experimentais foram analisados no software STATISTICA 7.0 StatSoft (1984-2004).

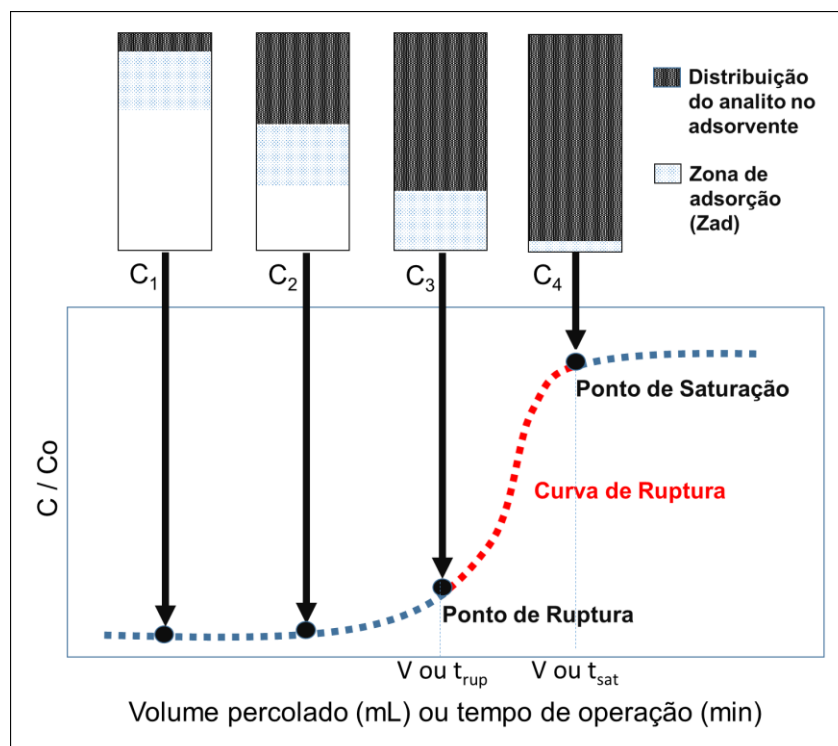
#### 4.9 CURVA DE RUPTURA

O desempenho do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, referente à capacidade máxima de adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  (ponto de saturação) foi estudado por meio de curvas chamadas “*breakthrough*” ou de ruptura, na ausência e presença de 0,5 e 1,5  $\text{g L}^{-1}$  BSA em condições dinâmicas, com intuito de avaliar o efeito da concentração dessa proteína na transferência de massa de Cu da solução para a superfície do polímero.

Toda curva de ruptura é obtida passando a solução (fluido) que contém o analito através de uma coluna empacotada com o adsorvente. Assim, por meio do monitoramento da concentração do analito no efluente, é possível observar a transferência de massa da fase líquida para a fase sólida em condições dinâmicas.

Uma curva de ruptura típica (Figura 21) é representada graficamente pela razão entre a concentração do efluente ( $C$ ) e a concentração da solução inicial ( $C_0$ ) ( $C/C_0$ ) em função do volume (mL) percolado (em vazão constante) ou em tempo de operação (min) [172]. O formato da curva é resultado vários fatores tais como: a transferência de massa ao longo da coluna, tamanho da coluna, concentração do analito e a vazão de pré-concentração (tempo de contato) [173].

**Figura 21.** Curva de ruptura (*breaktrough*) típica.



Fonte: adaptada da referência [172]

Como pode ser observado na Figura 21, inicialmente a maior parte da transferência de massa ocorre próxima à entrada da coluna, onde a solução entra em contato com o adsorvente e a concentração do analito no efluente (pontos  $C_1$  e  $C_2$ ) é praticamente zero (0). Depois de um intervalo de tempo, o analito encontra-se em equilíbrio entre a fase sólida (adsorvente) e a fase líquida (solução percolada), e nesse ponto (ponto de ruptura -  $C_3$ ), o adsorvente deixa de sorver 100,0% o analito. Por último, a coluna torna-se saturada e o adsorvente não adsorve mais o analito. Esse ponto é denominado ponto de saturação ( $C_4$ ) e corresponde à capacidade máxima de adsorção do material, em que o analito não tem mais interação com a coluna e encontra-se 100,0% no efluente.

Para este estudo foram percolados pela minicoluna, empacotada com 50,0 mg o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, 100,5 mL de uma solução de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de íons Cu<sup>2+</sup> em pH 4,50 sem tampão, na ausência e presença de BSA (0,5 ou 1,5 g L<sup>-1</sup>), sob as condições do sistema de pré-concentração em fluxo, mas sem acoplamento ao F AAS. Assim, o efluente foi coletado a cada 4 s, obtendo alíquotas de 0,5 mL, que corresponde ao volume mínimo para injetar e determinar o Cu pela técnica F AAS.

A quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> sorvido no polímero foi calculada experimentalmente para cada alíquota percolada, que representa cada ponto da curva, por meio da Eq. 11:

$$q = \frac{(C_o - C) V}{m} \quad \text{Eq. (11)}$$

Onde  $q$  é a quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> sorvido no polímero (mg g<sup>-1</sup>),  $V$  é o volume de solução percolado através da minicoluna (L),  $m$  é a massa de polímero (g),  $C_o$  é a concentração inicial de íons Cu<sup>2+</sup> (1,0 mg L<sup>-1</sup>) e  $C$  é a concentração de íons Cu<sup>2+</sup> no efluente.

A capacidade máxima de adsorção de íons Cu<sup>2+</sup> no polímero ( $q_{\text{Sat}}$ ) foi calculada pela somatória dos valores de  $q$ , calculado anteriormente para cada ponto. Assim, a partir do  $q_{\text{Rup}}$  do ponto de ruptura e do ponto de saturação ( $q_{\text{Sat}}$ ), foi determinado o volume de ruptura ( $V_{\text{Rup}}$ , mL) e saturação ( $V_{\text{Sat}}$ , mL).

O modelo cinético regressivo não linear de Thomas (1944) [174] foi aplicado aos dados, que foram utilizados para construir as curvas de ruptura, por meio do software MatLab (R2014a, MathWorks, Inc. Protected by US and international patents, Copyright 1984-2014) para avaliar o desempenho do polímero em leito fixo e calcular

a capacidade máxima de adsorção ( $q_{Th}$ ,  $mg\ g^{-1}$ ) em sistema contínuo com vazão constante.

A Eq. 12 representa o modelo não linear do Thomas para uma coluna de adsorção em leito fixo:

$$\left(\frac{C}{C_o}\right) = \frac{1}{1 + \exp\left[\frac{k_{Th}}{Q}(q_{Th}m - C_oV)\right]} \quad \text{Eq. (12)}$$

Em que,  $C_o$  é a concentração inicial do analito ( $mg\ mL^{-1}$ ),  $C$  é a concentração do analito no efluente no tempo  $t$  ( $mg\ mL^{-1}$ ),  $Q$  é a vazão volumétrica ( $mL\ min^{-1}$ ),  $m$  é a massa de adsorvente na minicoluna ( $g$ ),  $V$  é o volume do efluente ( $mL$ ) e  $k_{Th}$  é a constante de Thomas ( $mL\ min^{-1}\ mg^{-1}$ ). O parâmetro  $q_{Th}$  representa a capacidade máxima de adsorção do adsorvente ( $mg\ g^{-1}$ ) predito pelo modelo.

Ao substituir  $V = Q t$  na Eq. 12, temos a Eq. 13 - 15.

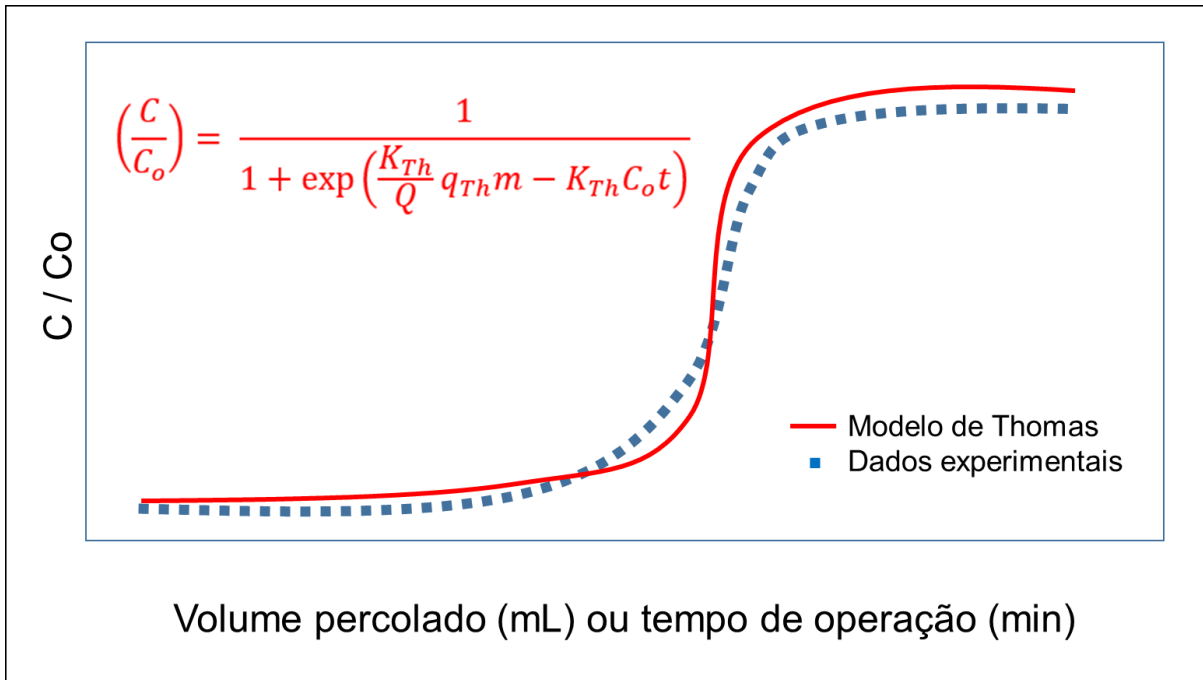
$$\left(\frac{C}{C_o}\right) = \frac{1}{1 + \exp\left[\frac{K_{Th}}{Q}(q_{Th}m - C_oQt)\right]} \quad \text{Eq. (13)}$$

$$\left(\frac{C}{C_o}\right) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{K_{Th}}{Q}q_{Th}m - \frac{K_{Th}}{Q}C_oQt\right)} \quad \text{Eq. (14)}$$

$$\left(\frac{C}{C_o}\right) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{K_{Th}}{Q}q_{Th}m - K_{Th}C_o t\right)} \quad \text{Eq. (15)}$$

A Figura 22 corresponde a representação gráfica do modelo Thomas aplicado uma curva de ruptura típica.

**Figura 22.** Modelo de Thomas aplicado a uma curva de ruptura.



**Fonte:** o próprio autor

#### 4.10 PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS $\text{Cu}^{2+}$ EM FIA-F AAS

O desempenho do método proposto para a pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de BSA foi avaliado a partir do cálculo dos parâmetros analíticos, tais como linearidade da curva analítica, fator de pré-concentração (FPC), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), eficiência de pré-concentração (EP), índice de consumo (IC), frequência analítica (FA), precisão e exatidão, utilizando o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em sistema FIA-F AAS sob as condições otimizadas.

Para isso, três curvas analíticas foram construídas pré-concentrando soluções contendo íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>), respectivamente, na faixa de concentração de 7,0 – 100,0 µg L<sup>-1</sup> de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 4,50 na ausência de tampão e vazão de 7,6 mL min<sup>-1</sup>. Além disso, três curvas analíticas foram construídas sem a etapa de pré-concentração (leitura direta no F AAS) na faixa de concentração de 100,0 a 6000 µg L<sup>-1</sup> de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 4,50 sem tampão, na ausência e presença de 0,5 e 1,5 g L<sup>-1</sup> de BSA. Desta forma o FPC foi calculado para as três condições [ $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>)] por meio da razão do coeficiente angular da curva analítica obtida com a etapa de pré-concentração e o coeficiente angular da curva analítica sem a etapa de pré-concentração. O limite de detecção (LD, do inglês *Limit of Detection*) e o limite de quantificação (LQ, do inglês, *Limit of*

*Quantification*) foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC, em que  $LD = (3 \times DP/b)$  e  $LQ = (10 \times DP/b)$ , sendo DP de  $n = 10$  da medida do branco analítico e  $b$  = coeficiente angular da curva analítica [175]. O LD corresponde à menor concentração do analito detectada pelo método proposto, mas não necessariamente quantificada, enquanto que, o LQ é a menor concentração do analito detectada que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais, sendo expresso em unidade de concentração [176]. A EP foi determinada pela razão entre o FPC e tempo de pré-concentração (min), enquanto que, o IC foi calculado pela razão entre o volume usado na etapa de pré-concentração (20,0 mL) e o FPC. A FA foi determinada como o número de análises realizadas por hora ( $h^{-1}$ ).

Com intuito de confirmar que o LQ teórico é de fato mensurável com exatidão e não altera a linearidade da curva analítica, soluções de íons  $Cu^{2+}$  na concentração dos LQ, calculados nas três condições [ $Cu^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ -BSA(0,5 g  $L^{-1}$ ) e  $Cu^{2+}$ -BSA(1,5 g  $L^{-1}$ )], foram preparadas em laboratório e submetida ao sistema FIA-FAAS. Com a média das absorbâncias obtidas ( $n = 3$ ), cada valor do LQ foi inserido na respectiva curva analítica como o primeiro ponto da curva. Este mesmo procedimento também foi realizado para os LQ calculados sem a etapa de pré-concentração.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade intra-dia ( $n=10$ ) e inter-dia ( $n=2$ ) pré-concentrando soluções contendo 7,0 e 80,0  $\mu g L^{-1}$  de íons  $Cu^{2+}$  na ausência e presença de BSA (0,5 g  $L^{-1}$ ), enquanto que, a exatidão foi determinada empregando o teste de adição/recuperação de solução padrão de íons  $Cu^{2+}$  diretamente nas amostras de leite, bem como pela digestão ácida assistida por micro-ondas, com determinação por GF AAS (Espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite), utilizando o equipamento PerkinElmer modelo AAnalyst 700.

#### 4.11 ESTUDO DE ÍONS INTERFERENTES

A pré-concentração *on-line* de íons  $Cu^{2+}$  em sistema FIA-F AAS, sob as condições otimizadas, também foi avaliada na presença de íons interferentes, tais como  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e citrato, por meio da comparação do sinal analítico (absorbância) obtido na ausência e presença do íon interferente. Estes íons interferentes foram escolhidos porque são encontrados comumente em amostras de leite bovino [177,178].

O efeito de interferência foi avaliado para cada íon e também a partir da mistura de todos eles. Deste modo, o estudo foi realizado percolando pela minicoluna, empacotada com 50,0 mg de IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, 20,0 mL de soluções binárias contendo Cu<sup>2+</sup> (50,0 µg L<sup>-1</sup>) e o íon potencialmente interferente [Fe<sup>3+</sup> (83,0 µg L<sup>-1</sup>), Al<sup>3+</sup> (76,5 µg L<sup>-1</sup>), Zn<sup>2+</sup> (183,0 µg L<sup>-1</sup>), Co<sup>2+</sup> (150,0 µg L<sup>-1</sup>), Ca<sup>2+</sup> (200,0 mg L<sup>-1</sup>), Mg<sup>2+</sup> (20,8 mg L<sup>-1</sup>), K<sup>+</sup> (268,3 mg L<sup>-1</sup>), Na<sup>+</sup> (81,7 mg L<sup>-1</sup>), Cl<sup>-</sup> (163,3 mg L<sup>-1</sup>) e citrato (0,3 mg L<sup>-1</sup>)] em pH 4,50 na ausência de tampão, na vazão de 7,6 mL min<sup>-1</sup>. A concentração do íon interferente foi estabelecida a partir da respectiva concentração média encontrada normalmente no leite (Quadro 7), em que a razão das concentrações médias do íon interferente/íon Cu foi multiplicada pela concentração de Cu adotada neste estudo (50,0 µg L<sup>-1</sup>). Igualmente, uma solução contendo o íon Cu<sup>2+</sup> e todos os íons interferentes, nas mesmas concentrações utilizadas nas soluções binárias, foi pré-concentrada. Cabe salientar que o estudo de íons interferentes também foi realizado na presença de 0,5 g L<sup>-1</sup> de BSA, que é a concentração comumente encontrada dessa proteína em amostras de leite bovino.

**Quadro 7.** Concentrações dos íons encontrados comumente em amostras de leite bovino.

Íons	Leite bovino Concentração mg kg <sup>-1</sup>			Íon interferente/ íon Cu <sup>2+</sup>	
	Min.	Máx.	Média		
Micro nutrientes	Cu <sup>2+</sup>	0,30	0,30	0,30	-
	Fe <sup>3+</sup>	0,30	0,70	0,50	1,66
	Zn <sup>2+</sup>	0,74	1,45	1,10	3,66
	Al <sup>3+</sup>	0,46	0,46	0,46	1,53
	Co <sup>2+</sup>	0,50	1,30	0,90	3,00
Macro nutrientes	Ca <sup>2+</sup>	1070,00	1330,00	1200,00	4000,00
	Mg <sup>2+</sup>	90,00	160,00	125,00	416,66
	K <sup>+</sup>	1440,00	1780,00	1610,00	5366,66
	Na <sup>+</sup>	400,00	580,00	490,00	1633,33
Ânions	Cl <sup>-</sup>	900,00	1060,00	980,00	3266,66
	Citrato	1,32	2,79	2,06	6,86

Min.: concentração mínima; Máx.: concentração máxima. **Fonte:** adaptado da referência [177,178]

Percentuais de recuperação do sinal analítico de íons Cu<sup>2+</sup> variando de 90,0% a 115,0% foram considerados toleráveis para prever ausência de interferência.

#### 4.12 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto em amostras reais, foram analisadas 18 amostras de leite de bovino (8 integrais, 8 desnatadas e 2 zero lactose) e 4 amostras de leite de soja (3 integrais e 1 zero açúcar), em caixa e de 12 marcas diferentes, adquiridas em mercados da região de Londrina. O valor nutricional das amostras reportado pelos fabricantes foi resumido no Quadro 8, com intuito de comparar a composição dos leites, uma vez que a concentração dos nutrientes pode influenciar na pré-concentração e determinação dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  no sistema FIA-F AAS. Além disso, o valor do pH de cada amostra foi verificado e inserido no Quadro 8.

**Quadro 8.** Valor nutricional (1 copo = 200,0 mL) e valor de pH de diferentes tipos de leite bovino (integral e desnatado) e leite de soja.

Valor nutricional porção de 200 mL (1 copo)	M1- Bov		M2- Bov		M3- Bov		M4- Bov		M5- Bov		M6- Bov		M7- Bov		M8- Bov		M9- Bov		M10- Soja	M11- Soja	M12- Soja	
	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Int	Des	Zlac	Zlac	Int	Int	Int	Int*
<b>Carboidratos (g)</b>	10,0	10,0	9,0	9,3	9,0	8,7	9,3	9,4	9,6	9,3	9,1	9,6	9,1	9,6	9,0	9,0	9,0	9,0	4,8	11,0	3,1	1,7
<b>Proteínas (g)</b>	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	7,4	6,2	6,3	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,3	6,3	6,2	6,2	5,2	5,2	6,2	5,1
<b>Gord. Totais (g)</b>	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0	6,4	2,6	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0	2,0	2,4	3,1	3,0	3,4	3,4
<b>Gord. Saturadas (g)</b>	4,0	0,0	3,8	0,0	3,1	0,0	3,7	0,0	3,6	1,5	4,7	0,0	4,7	0,0	4,5	0,0	1,2	1,5	0,4	0,4	0,7	0,7
<b>Gord. Trans (g)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Fibra alimentar (g)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	1,1	0,0
<b>Sódio (mg)</b>	100	100	130	130	140	140	143	143	126	126	171	136	171	136	124	161	130	128	166	53	17	109
<b>Cálcio (mg)</b>	240	240	210	210	220	210	240	240	238	238	238	224	238	224	230	230	210	232	240	240	240	240
<b>Ferro (mg)</b>	-	-	4,2	-	-	-	-	-	4,2	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Zinco (mg)</b>	-	-	2,1	-	-	-	-	-	2,1	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	1,1	-	1,1
<b>Cobre (µg)</b>	-	-	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>pH</b>	6,45	6,67	6,71	6,69	6,71	6,67	6,66	6,68	6,65	6,63	6,65	6,65	6,72	6,65	6,75	6,67	6,70	6,71	7,14	6,7	7,28	7,24

M: marca; Bov: bovino, Int: leite integral, Des: Leite desnatado, Zlac: zero lactose, \*Zero adição de açúcar.

Como pode ser observado no Quadro 8, apenas a amostra M2-Bov-Int (enriquecida com Cu pelo fabricante) reporta  $675,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu no valor nutricional. Essa concentração provavelmente pode ser determinada pela aspiração direta no F AAS. Assim, testes preliminares foram realizados para determinar a concentração de Cu na amostra M2-Bov-Int como descrito na seção 4.12.1, sem tratamento prévio da amostra.

Por outro lado, todas as amostras apresentadas no Quadro 8, inicialmente foram digeridas usando o método de digestão ácida assistida por micro-ondas (seção 4.12.2) e em seguida submetidas a pré-concentração *on-line* em sistema FIA-F AAS para determinar a concentração do Cu. Depois, as únicas amostras contendo Cu foram preparadas seguindo o procedimento do método proposto descrito na seção 4.12.3. Finalmente, os resultados da concentração do Cu determinada pelo método proposto e pela digestão ácida assistida por micro-ondas foram comparados entre si e também com o valor reportado pelo fabricante (M2-Bov-Int).

O teste de adição/recuperação de solução padrão de íons  $\text{Cu}^{2+}$  diretamente nas amostras de leite foram realizados para o método de digestão ácida assistida por micro-ondas, bem como para o método proposto. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para validar a exatidão do método, as concentrações do íon  $\text{Cu}^{2+}$  obtidas nas amostras de leite pelo método proposto (seção 4.12.3) foram comparadas com as concentrações do íon  $\text{Cu}^{2+}$  encontradas por digestão ácida assistida por micro-ondas com determinação pela técnica de referência GF AAS. Para isto, um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) da PerkinElmer modelo AAAnalyst 700 foi operado nas seguintes condições: lâmpada de cátodo oco de Cu com corrente de 15,0 mA e comprimento de onda de 324,8 nm; largura de banda espectral de 0,7 nm; vazão de gás de purga (Argônio com pureza de 99,9%, White Martins, São Paulo, SP, Brasil):  $1,7 \text{ L min}^{-1}$ ; volume de injeção:  $20,0 \mu\text{L}$ ; e modificador permanente:  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . As análises foram feitas em tubos de grafite pirolíticos com plataforma de L'vov (Perkin Elmer, cat. No B0109324). Os parâmetros do programa de temperatura foram: secagem ( $110^\circ \text{C}$ , 10 s), pirólise ( $1100^\circ \text{C}$ , 10 s), atomização ( $2300^\circ \text{C}$ , 3 s) e limpeza ( $2400^\circ \text{C}$ , 5 s).

#### 4.12.1. Determinação de Íons $\text{Cu}^{2+}$ por Aspiração Direta da Amostra no F AAS.

Este experimento foi realizado para checar a possibilidade de determinação direta de Cu em leite bovino enriquecido, utilizando um procedimento simples de diluição. Para isto, a amostra M2-Bov-Int foi aspirada diretamente no F AAS com e sem diluição, nas seguintes condições: **(a)** leite bovino puro, **(b)** leite:água 75,0: 25,0 (% v/v), **(c)** leite:água 50,0: 50,0 (% v/v), **(d)** leite:água 25,0: 75,0 (% v/v), **(e)** leite:água 10,0: 90,0 (% v/v). Assim, a concentração de Cu no leite bovino M2-Bov-Int, nas cinco condições descritas anteriormente, foi calculada por meio de uma curva analítica construída em água ultrapura na faixa de concentração de 0,1 a 4,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{Cu}^{2+}$ . Os resultados deste experimento foram expressos como porcentagem de recuperação de Cu em relação ao valor reportado pelo fabricante.

#### 4.12.2. Preparo das Amostras por Digestão Ácida Assistida por Micro-ondas.

Foram transferidas para um tubo de Teflon 5,15 g de amostra e misturadas com 3,0 mL de ácido nítrico (65,0%) bidestilado com um sistema de sub-ebulição Berghof® BSB-939-IR (Eningen, Alemanha), 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (29,0%) e 9,0 mL de água ultrapura a temperatura ambiente (25 °C) [148,151]. A mistura foi deixada por 24 h (*overnight*) para a pré-digestão da amostra e, depois, submetida a digestão utilizando o micro-ondas Ethos One Milestones Inc® (Sorisole, Itália) em um potencial fixo de 1200 W e um gradiente de temperatura linear. O programa de aquecimento utilizado na digestão foi o seguinte: etapa 1 - aquecimento até 120 °C (0,0 - 12,0 min); etapa 2 - temperatura constante em 120 °C (12,1 - 17,0 min); etapa 3 - aquecimento até 190 °C (17,1 - 27,0 min); etapa 4 - temperatura constante em 190 °C (27,1 - 42,0 min). Para diminuir a pressão interna dos tubos e refrigerar as amostras digeridas, foi aplicado um tempo de exaustão de 30,0 min. Após esse tempo, as amostras digeridas foram transferidas para béqueres de 50,0 mL e aquecidas em uma chapa até quase seca para evaporar o  $\text{HNO}_3$  residual. O resíduo foi resfriado à temperatura ambiente e dissolvido em 30,0 mL de água ultrapura. Em seguida, o pH e o volume final das amostras foram ajustados para 4,50 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,10 e 1,00 mol L<sup>-1</sup>) na ausência de tampão e 50,0 mL, respectivamente, completando com água ultrapura. A solução obtida foi submetida a pré-concentração *on-line* usando o sistema FIA-F AAS sob as condições otimizadas. Para o ajuste do pH das amostras foi utilizado  $\text{NH}_4\text{OH}$ , uma vez que o  $\text{NaOH}$  interferiu na pré-concentração e determinação dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Os brancos

das amostras foram preparados sob os mesmos procedimentos e todas as amostras foram digeridas em triplicata.

#### 4.12.3. Preparo das Amostras pelo Método Proposto

Foram pesadas 5,15 g de cada amostra em um béquer e misturadas com 30,0 mL de água ultrapura. O pH e o volume final das amostras foram ajustados para 4,50 com HCl (0,10 mol L<sup>-1</sup>) na ausência de tampão e 50,0 mL, respectivamente. Em seguida, a separação do sobrenadante e do precipitado foi realizada com o auxílio de um tubo cônico de falcon (50,0 mL) e uma centrífuga QUIMIS® modelo 0222T2 (Diadema, SP, Brazil) por 10,0 min a 1600 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a pré-concentração *on-line* usando o sistema FIA-F AAS sob as condições otimizadas. Os brancos da amostra foram preparados sob o mesmo procedimento e as amostras foram preparadas em triplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

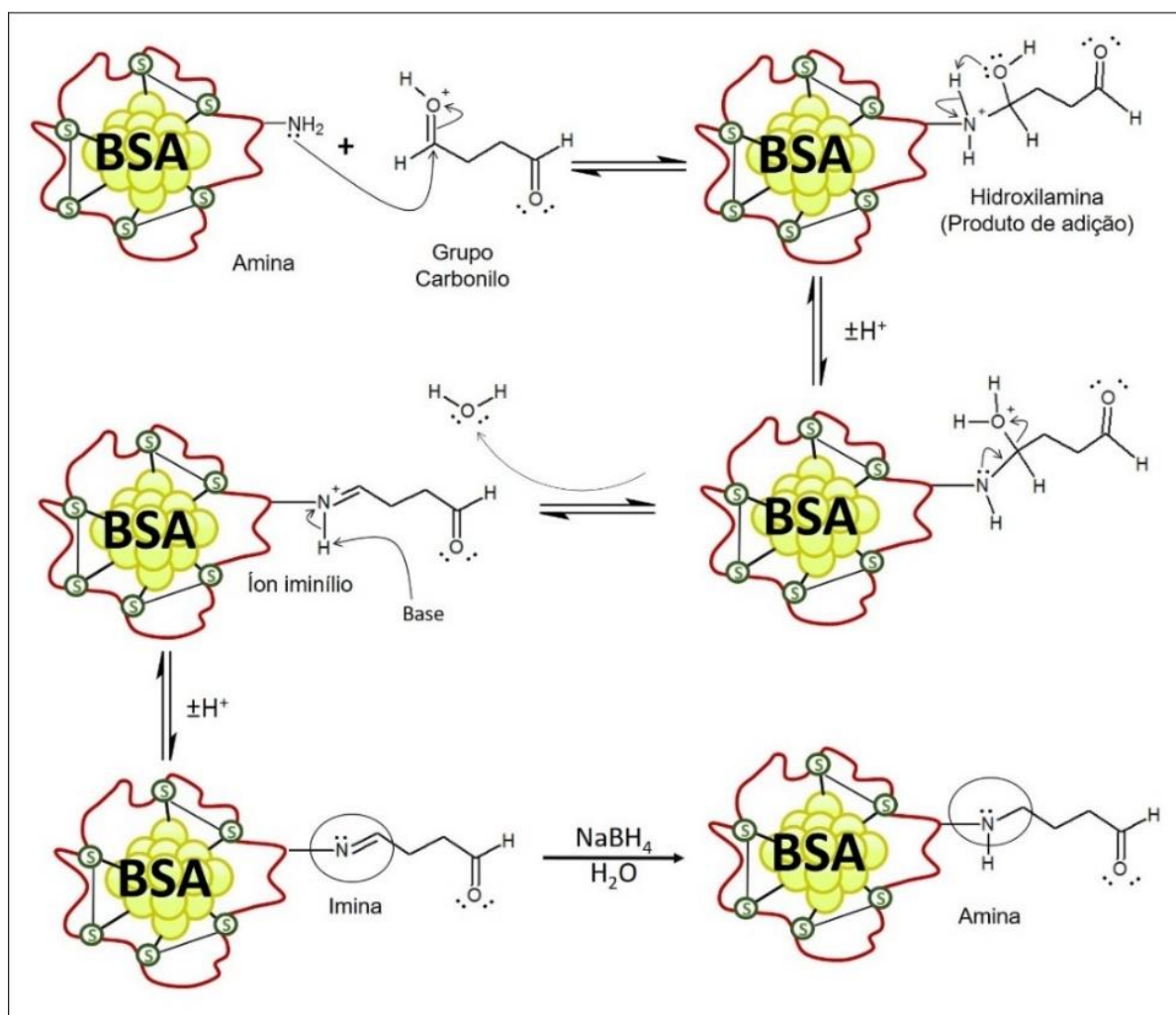
Para uma melhor compreensão da estrutura e discussão dos resultados obtidos nesta Tese, inicialmente serão apresentados os resultados da síntese e caracterização dos polímeros. Na sequência, serão apresentados os resultados do estudo de pH, exclusão de proteínas e seletividade. Por fim, com base no polímero com melhor desempenho na pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e exclusão de proteínas, serão apresentados os resultados do método analítico proposto, os quais incluem: otimização da pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em sistema FIA-F AAS por meio da análise multivariada, curva de ruptura, parâmetros analíticos (linearidade da curva analítica, limite de detecção e quantificação, fator de pré-concentração, eficiência de pré-concentração, índice de consumo, frequência analítica, precisão e exatidão), estudo de íons interferentes e aplicação em amostra reais (leite bovino e soja).

### 5.1 SÍNTESE DOS POLÍMEROS

Foi avaliada em estudos preliminares, a influência do tempo de adição do co-mônômero HEMA (antes e depois da etapa de pré-polimerização) na adsorção de Cu e exclusão de proteínas. Observou-se que o tempo de adição do co-mônômero não influenciou na exclusão de proteínas. Assim, o HEMA foi adicionado na síntese junto com os outros reagentes em uma única etapa, interagindo com íons  $\text{Cu}^{2+}$  e formando uma camada hidrofílica sobre a superfície das partículas impressas, como meios de acesso restrito [66, 179].

Em relação a imobilização da proteína BSA sobre a superfície do polímero ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub> (descrita na seção 4.2) ocorreu a reação de adição nucleofílica da amina primária (BSA) sobre o grupo carbonila (eletrófilo) do aldeído (glutaraldeído), formando um hemiacetal como produto intermediário que, por sua vez, perde uma molécula de água para formar a imina, como é ilustrado na Figura 23. A imina é reduzida a amina utilizando borohidreto de sódio para dar estabilidade à camada de BSA, evitando reações colaterais com outros íons ou moléculas [67,68].

**Figura 23.** Reação de adição nucleofílica sobre o carbonilo eletrofílico do glutaraldeído e redução da imina para amina na imobilização de BSA sobre o polímero  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ .



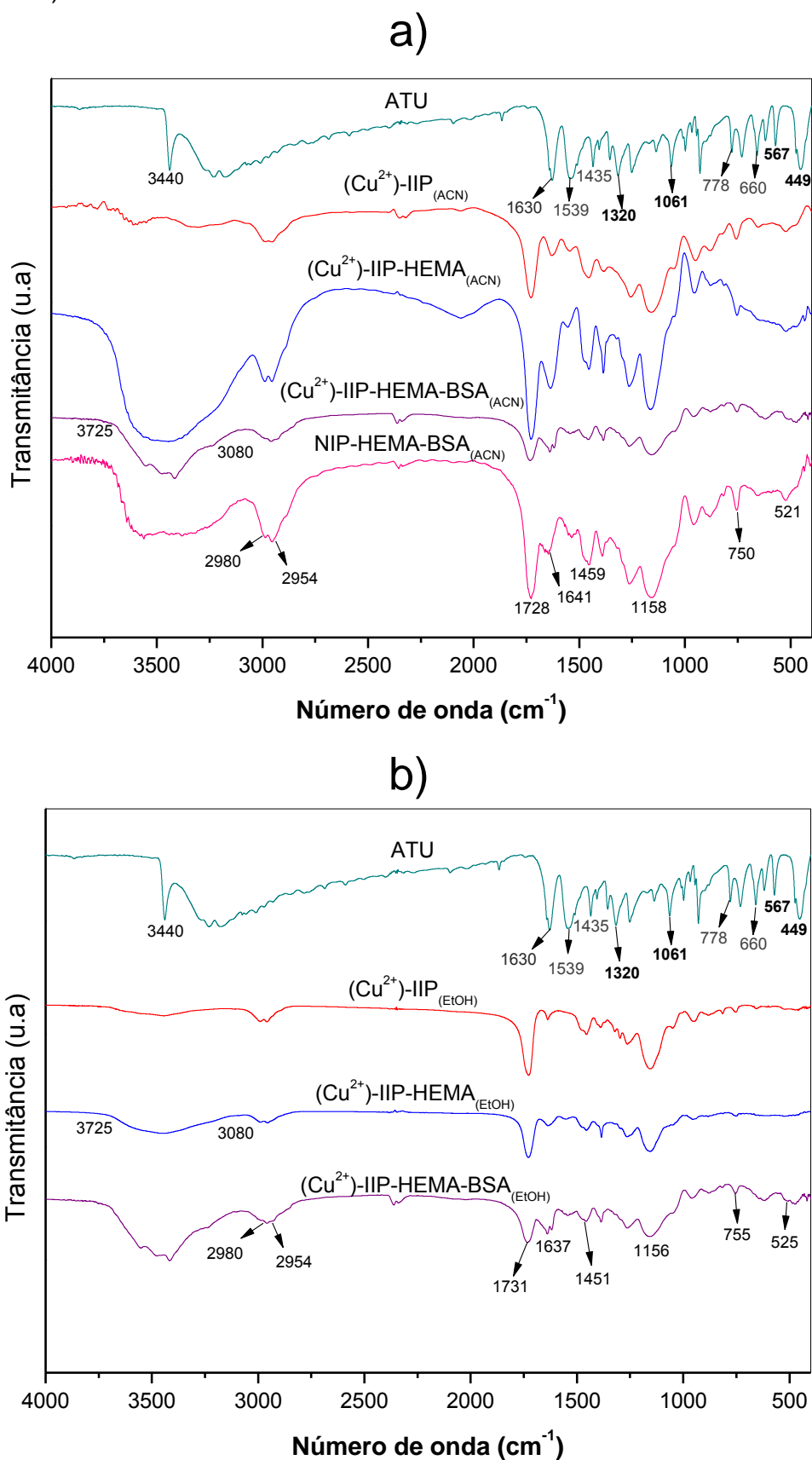
Fonte: adaptada da referência [180]

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

### 5.2.1 Espectroscopia FT-IR

A espectroscopia de infravermelho FT-IR permitiu registrar os principais grupos funcionais presentes na ATU pura e nos polímeros, sendo que o perfil espectral dos polímeros sintetizados em ACN (Figura 24a) e EtOH (Figura 24b) foi similar. O espectro da ATU pura foi utilizado para identificar o modo de interação entre a ATU e os íons  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Figura 24.** Espectro FT-IR da ATU pura e dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}$  e NIP-HEMA-BSA sintetizados em: a) acetonitrila (ACN); e b) etanol (EtOH).



No espectro FT-IR da ATU (Figura 24) foram observadas as bandas 3440 e 1630  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento assimétrico e deformação vibracional da amina secundária  $\nu(\text{H-N-H})$ , respectivamente. A banda 1630  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser atribuída ao estiramento do grupo vinílico  $\nu(\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-)$ . Em 1539  $\text{cm}^{-1}$  foi observado uma banda que corresponde ao estiramento do íon  $-\text{HN-C}^+-\text{S}^-$ , também chamada como “*thioureide band*” por Randall e colaboradores [181]. A banda de absorção em 1435  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento vibracional da ligação N-C-N e à vibração assimétrica do C=S [182,183]. As bandas em 1320 e 1061  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento vibracional do grupo tiocarbonilo C=S [99,158], enquanto as bandas em 778 e 660  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao caráter da ligação dupla do C=S [184,185]. Em 567 e 449  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a deformação angular assimétrica da ligação N-C-N e à deformação simétrica do grupo (N-C=S), respectivamente [182,183,186].

Ao comparar os espectros FT-IR da ATU pura e dos polímeros, pode-se observar que as bandas presentes na ATU em 1320, 1061, 660 e 449  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos grupos C=S, N-C-N e N-C=S foram suprimidas nos espectros dos polímeros impressos, enquanto as bandas 1539, 1435, 750 e 521  $\text{cm}^{-1}$  foram deslocadas. Desta forma, o deslocamento e/ou ausência das bandas mencionadas anteriormente, bem como o leve aumento da intensidade das bandas 750 e 521  $\text{cm}^{-1}$  (caráter da ligação dupla C=S e deformação angular assimétrica da ligação N-C-N, respectivamente) no NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em relação com os outros polímeros, permitiu inferir que a coordenação entre o Cu e a ATU ocorre mediante o átomo de enxofre (Cu-S) [157,158,187,188]. Dessa forma, após a coordenação  $\text{Cu}^{2+}$ -ATU, a natureza da vibração C=S é ligeiramente alterada devido à diminuição do caráter da ligação dupla C=S e ao aumento do caráter da ligação C-N no grupo (N-C=S) [186-188].

Além das bandas mencionadas, os principais grupos funcionais presentes no co-monômero HEMA e no EGDMA foram identificados nos espectros FT-IR dos polímeros. Assim, uma ampla banda de absorção em torno de 3725-3080  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação O-H e ao estiramento do grupo  $\text{NH}_2$ . As bandas em 2980 e 2954  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento assimétrico das ligações C-H, -CH<sub>2</sub>- e -CH<sub>3</sub> presentes na cadeia dos polímeros e no EGDMA [189]. A banda de absorção em 1728  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento do grupo carbonila proveniente do HEMA e EGDMA, enquanto que a banda em 1158  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico dos grupos -C-OH e O=C-O- (Éster) [106,184]. A banda em 1641  $\text{cm}^{-1}$  confirma a presença de grupos vinílicos residuais (CH<sub>2</sub>=CH-) na matriz polimérica. A

banda em  $750\text{ cm}^{-1}$  confirmou a presença do grupo tiocarbonilo (C=S) na matriz polimérica. Portanto, os espectros FT-IR dos polímeros confirmaram que a reação de polimerização ocorreu satisfatoriamente.

Em relação a inserção do HEMA e BSA na matriz polimérica, foi observado que a presença desses modificadores de superfície não alterou o perfil espectral dos polímeros sintetizados em ACN (Figura 24a), bem como os polímeros sintetizados em EtOH (Figura 24b).

É importante ressaltar que a remoção do Cu da matriz polimérica não modificou o perfil dos espectros FT-IR para os polímeros sintetizados em ACN e EtOH (espectros não apresentados).

Com o propósito de identificar melhor as diferenças entre as bandas dos espectros FT-IR dos polímeros sintetizados em ACN e EtOH, os sinais foram transformados e representados em absorvância (Abs) (Anexo A e B), pela relação  $Abs = 2 - \text{Log}_{10} \%T$ , uma vez que a absorvância pode ser considerada mais sensível quando comparado com a transmitância porcentual, devido ao maior número de caixas decimais obtidas na transformação das escalas. Porém, os espectros apresentados em absorvância mantem o mesmo perfil que os apresentados em transmitância porcentual, ainda separando em dois intervalos de número de onda, de  $4000$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  e de  $2000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.2.2 Análise térmica

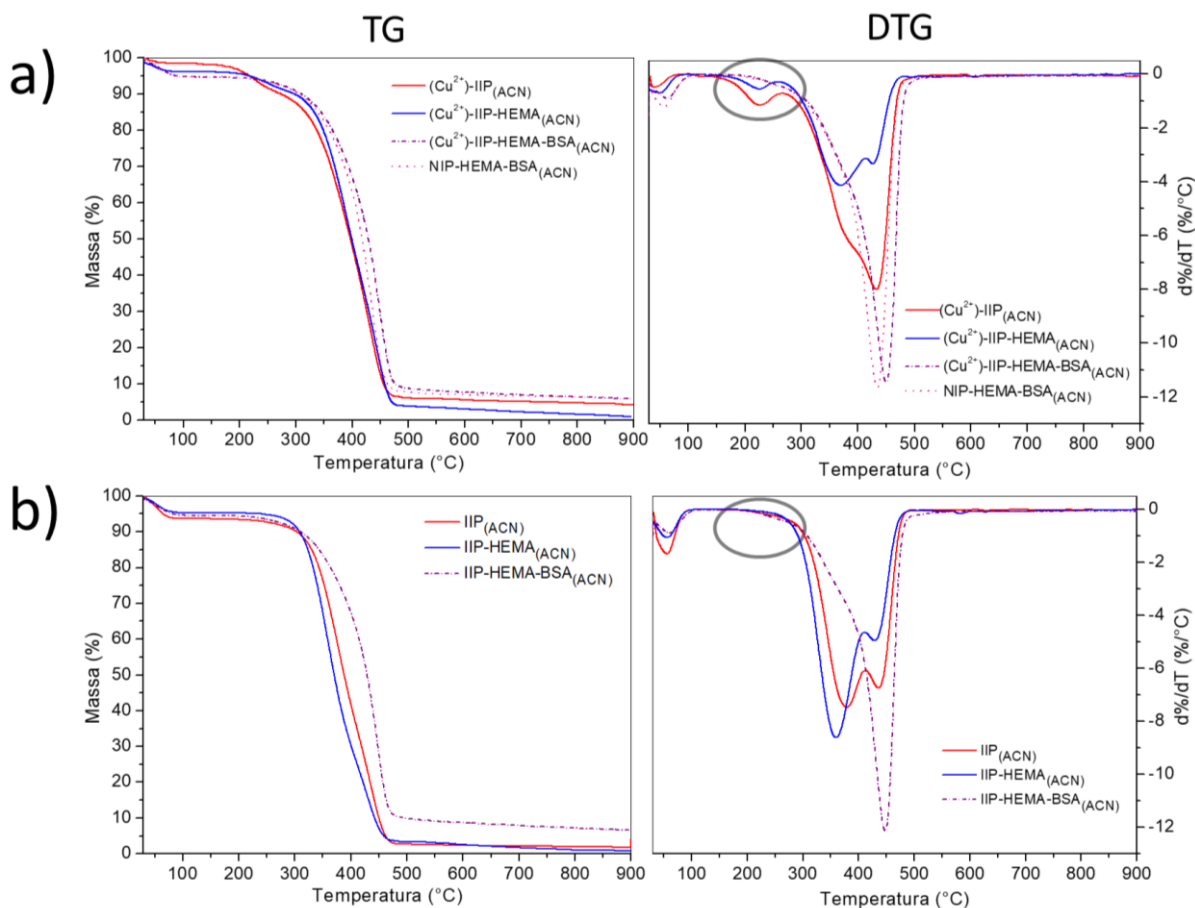
O comportamento térmico dos polímeros foi avaliado pelas curvas TG e DTG, que apresentam a perda de massa em função da temperatura na faixa de  $30$  a  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 25 e 26), na ausência e presença do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na matriz polimérica.

Os polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  apresentaram três eventos de decomposição bem definidos, enquanto que  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  mostraram apenas um evento de decomposição (Figura 25a - DTG).

A remoção da água adsorvida fisicamente na superfície dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  foi observada no intervalo de temperatura de  $30\text{-}85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com taxa de perda máxima em  $40$ ,  $97$ ,  $62$  e  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  e porcentagem de perda de massa de  $1,5\%$ ,  $4,4\%$ ,  $5,2\%$  e  $5,0\%$ , respectivamente. Os polímeros que contém os modificadores HEMA e BSA como

meios de acesso restrito, absorveram mais água devido ao caráter hidrofílico dessas moléculas, interagindo com a água por meio de ligações de hidrogênio.

**Figura 25.** Curvas termogravimétricas TG (esquerda) e derivada DTG (direita) dos polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN): (a) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ ; e (b) íon  $\text{Cu}^{2+}$  removido da matriz polimérica.



No primeiro evento de decomposição (Figura 25a - DTG), observado na faixa de 165-270 °C, ocorreu uma ligeira perda de massa de 8,3% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$  e 5,1% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ , com taxa de perda máxima em 225 °C (1,1 %/°C) e 224 °C (0,5 %/°C), respectivamente, atribuída à fragmentação dos segmentos da ATU [99], como observado também no perfil de degradação da ATU pura (Anexo C), e volatilização do Cu na forma de sulfeto ( $\text{CuS}$ ), cujos pontos de fusão e de ebulição são 103 e 220 °C, respectivamente [190,191].

O segundo evento, na faixa de temperatura de 270-412 °C, mostrou perda de massa significativa de 44,1% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$  com taxa de perda máxima em 382 °C (5,9 %/°C) e 51,0% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  com taxa de perda máxima em 368 °C (4,0 %/°C), que foi atribuído à decomposição das cadeias curtas da matriz

polimérica. O terceiro evento, observado entre 412 °C e 510 °C, pode ser atribuído à descarboxilação dos segmentos do HEMA e EGDMA [79], com taxa de perda máxima em 433 °C (7,7 %/°C) e 427 °C (3,2 %/°C) com perda de massa de 39,0% e 35,3% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ , respectivamente.

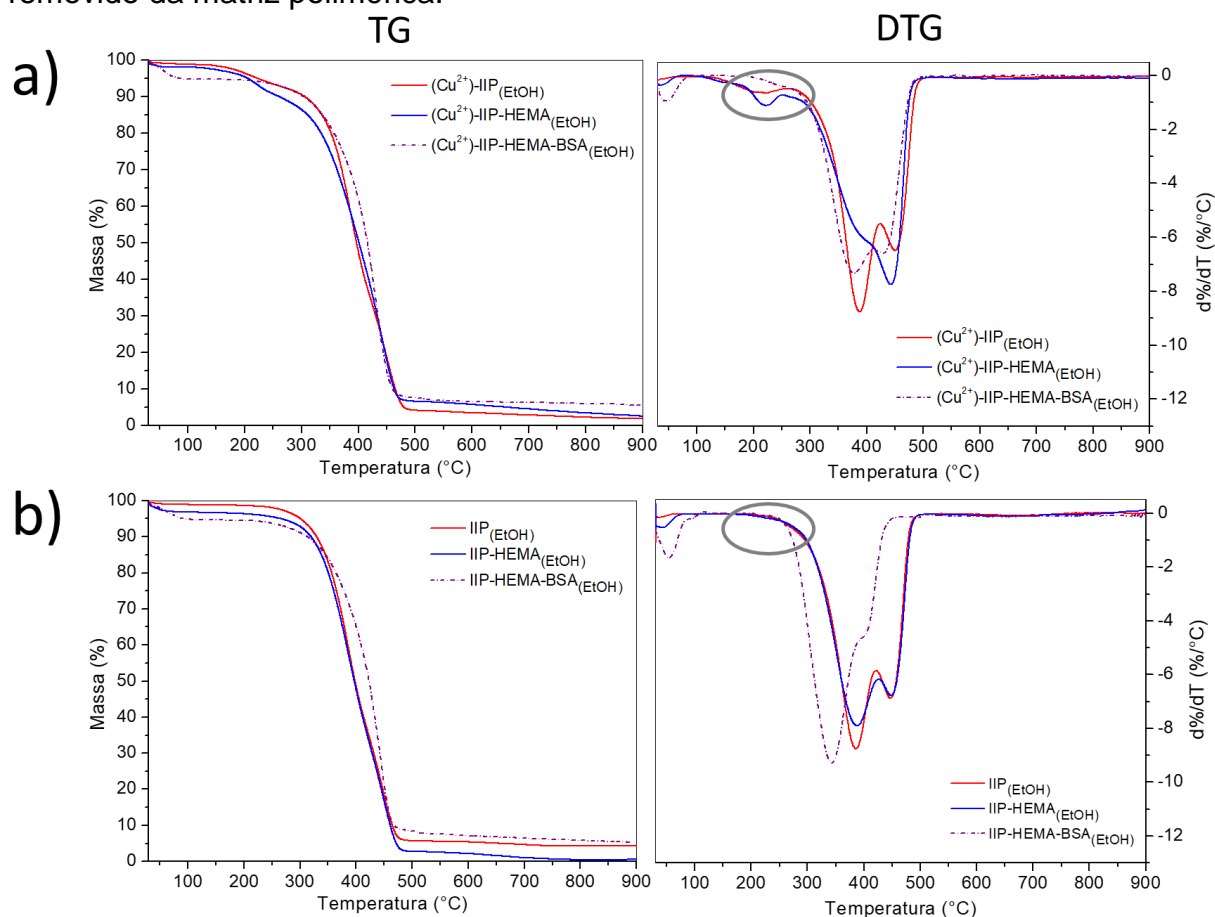
Um único evento de degradação foi observado para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ , na faixa de temperatura de 205-525 °C, com taxa de perda máxima em 450 °C (11,43 %/°C) e 435 °C (11,6 %/°C), e perda em massa de 86,6% e 86,3%, respectivamente. Este fato pode ser atribuído às diversas interações (interação dipolo-dipolo, força de dispersão de London, ligação de hidrogênio e ligação não polar) entre a proteína BSA e os grupos funcionais presentes na matriz polimérica [192], ocasionando a interconexão das cadeias poliméricas. Desta forma, durante a decomposição do  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  não é possível identificar com clareza os diferentes segmentos da ATU (Anexo C), HEMA e EGDMA que constituem a cadeia polimérica, assim como da BSA ancorada (Anexo D), apresentando, dessa forma, um único evento de decomposição.

Foram obtidas porcentagens residuais de 7,1%, 4,2%, 8,2% e 8,7% para  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ , respectivamente. Assim, os polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  apresentaram maiores porcentagens residuais, devido à maior interconexão das cadeias poliméricas, e maior estabilidade térmica, uma vez que se decompõem acima de 205 °C.

Cabe salientar, que ao remover o íon  $\text{Cu}^{2+}$  da matriz polimérica (Figura 25b-DTG), foi observado um comportamento térmico similar ao obtido na presença do íon  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 25a-DTG), com a exceção do evento de decomposição entre 165-270 °C para os polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ , uma vez que a ausência do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na estrutura do polímero desloca a degradação dos segmentos da ATU para temperaturas mais altas, ocorrendo uma sobreposição dos eventos que podem ser observados na inflexão da curva TG da Figura 25b.

Foi observado um comportamento térmico semelhante para os polímeros sintetizados em EtOH, como é apresentado na Figura 26. No entanto, o polímero  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{EtOH})}$  (Figura 26a – DTG), não apresentou remoção de água na faixa de temperatura de 30-85 °C, o que permite inferir que esse polímero apresenta características hidrofóbicas, conforme foi corroborado no estudo de molhabilidade.

**Figura 26.** Curvas termogravimétricas TG (esquerda) e derivada DTG (direita) dos polímeros sintetizados em etanol (EtOH): (a) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ ; e (b) íon  $\text{Cu}^{2+}$  removido da matriz polimérica.

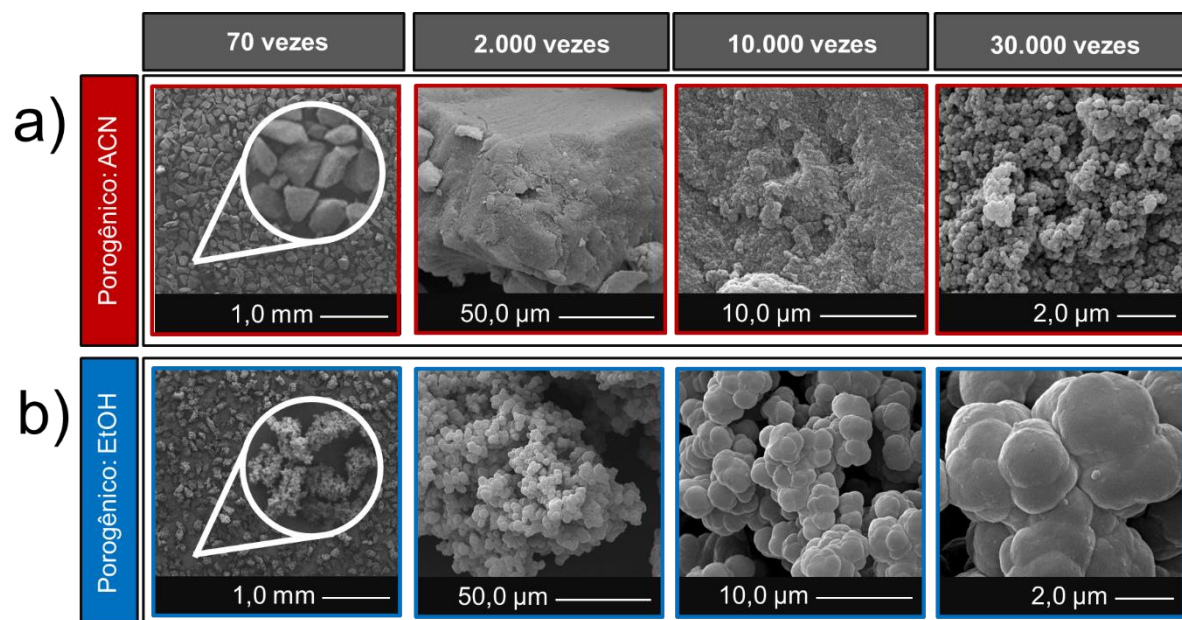


Por outro lado, o  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{EtOH})}$  apresentou dois eventos de decomposição, com taxa de decomposição máxima em  $375^{\circ}\text{C}$  e  $432^{\circ}\text{C}$ , indicando que, possivelmente as cadeias poliméricas do  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{EtOH})}$  apresentam menor interconexão quando comparadas com as partículas do polímero sintetizado em ACN.

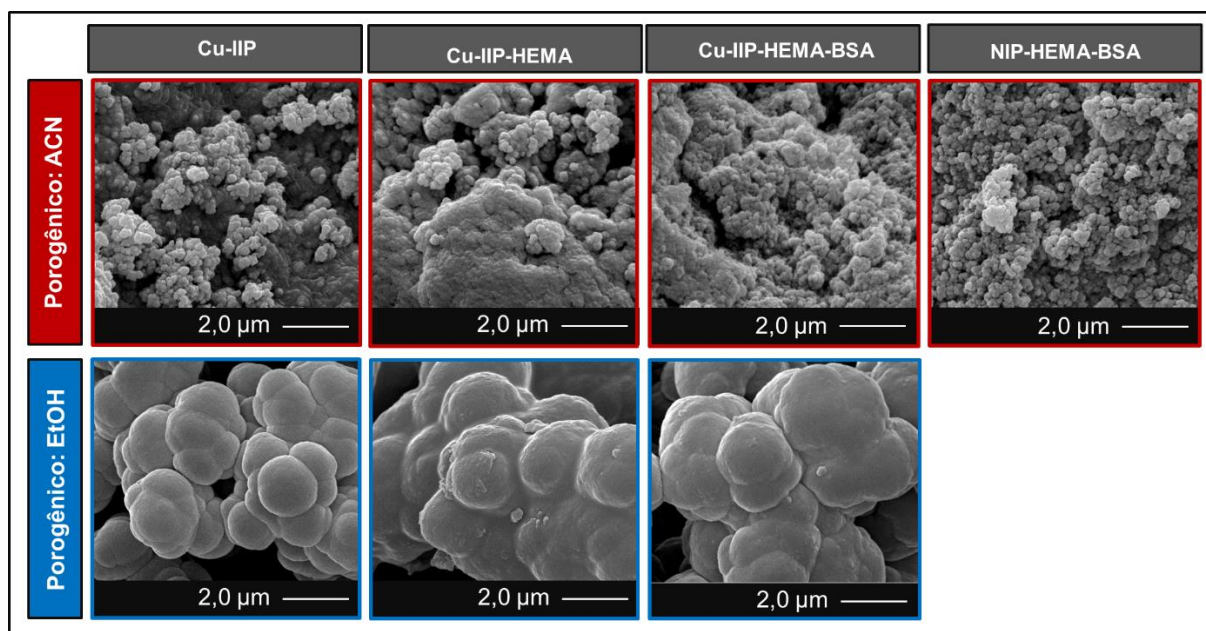
### 5.2.3 Imagens MEV e Fisissorção de Gás $\text{N}_2$

As imagens MEV dos polímeros sintetizados em ACN e EtOH são apresentadas nas Figuras 27 e 28. Porém, devido ao perfil similar que apresentam as micrografias dos polímeros com e sem meios de acesso restrito, na Figura 27 são apresentadas unicamente as imagens MEV em diferentes ampliações do polímero  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}$  sintetizado nos dois solventes, para observar detalhadamente a influência do porogênico na morfologia dos polímeros, enquanto na Figura 28 são apresentadas as imagens MEV de todos os polímeros em uma única escala.

**Figura 27.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura nas ampliações 70, 2000, 10.000 e 30.000 vezes com barra de escala de 1,0 mm, 50  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  e 2,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente, do polímero  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA sintetizado em acetonitrila (ACN) e etanol (EtOH).



**Figura 28.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA sintetizados em ACN e EtOH, e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, com ampliação de 30.000 vezes e escala de escala de 2,0  $\mu\text{m}$ .



Durante a síntese do polímero, primeiramente, o monômero polimeriza na presença do reticulante EGDMA e do iniciador radicalar (AIBN), precipitando e formando núcleos (nanoesferas). Esses núcleos competem com o monômero

solvatado pelo solvente porogênico, para finalmente crescerem e formar uma matriz polimérica porosa [193,194]. Portanto, devido à maior solubilidade (solvatação) do monômero ATU em EtOH, sua concentração é maior no solvente porogênico do que nos núcleos de polimerização, o que leva à formação de partículas agregadas e coesas, com formato esférico e pequenos poros (Figura 27b). Por outro lado, na situação do solvente ACN (não solvatante) a ATU polimeriza preferencialmente nos núcleos já formados, em comparação com a polimerização no solvente, e como resultado esses núcleos continuam crescendo até a formação de aglomerados altamente reticulados (glóbulos). Outro aspecto importante é que a baixa miscibilidade da ATU em ACN, faz com que, o solvente interaja menos com a rede polimérica, e por consequência, haverá liberação do solvente, gerando maiores poros e maior área superficial no polímero (Figura 27a e Tabela 1) [193-196].

**Tabela 1.** Área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poros dos polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN) e em etanol (EtOH), com e sem remoção do íon  $\text{Cu}^{2+}$  da matriz polimérica.

Polímeros	Área superficial específica - $S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )		Volume total de poro $V_{\text{TP}}$ $\times 10^{-1}$ ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )		Diâmetro médio de poros (nm)	
	ACN	EtOH	ACN	EtOH	ACN	EtOH
IIP	351,10	1,69	9,35	0,06	11,73	14,21
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP	224,70	1,16	10,37	0,04	19,14	16,17
IIP-HEMA	255,20	29,72	5,96	0,30	10,32	5,04
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA	222,60	17,41	7,67	0,22	14,48	5,96
IIP-HEMA-BSA	63,78	45,76	2,56	0,44	16,68	4,36
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA-BSA	52,03	27,99	2,13	0,35	16,98	5,82
NIP-HEMA-BSA	65,72	-	2,85	-	18,16	-

Experimentalmente foi observado que a reação de polimerização em EtOH ocorreu mais rapidamente, cerca de 15,0 min, em comparação com os polímeros sintetizados em ACN (30,0 min). Este comportamento pode ser atribuído à afinidade da ATU com o solvente porogênico, uma vez que devido à baixa solubilidade da ATU em ACN, se requiere de maior tempo para dar início à precipitação das partículas, quando comparado com as partículas formadas em EtOH.

Na Tabela 1 pode ser observado que a adição do co-monômero HEMA na síntese dos polímeros em ACN diminui a área superficial, o volume e o diâmetro de poro dos polímeros. Este comportamento deve-se ao caráter hidrofílico do HEMA, em que o co-monômero é pouco solvatado pela ACN e o crescimento das partículas

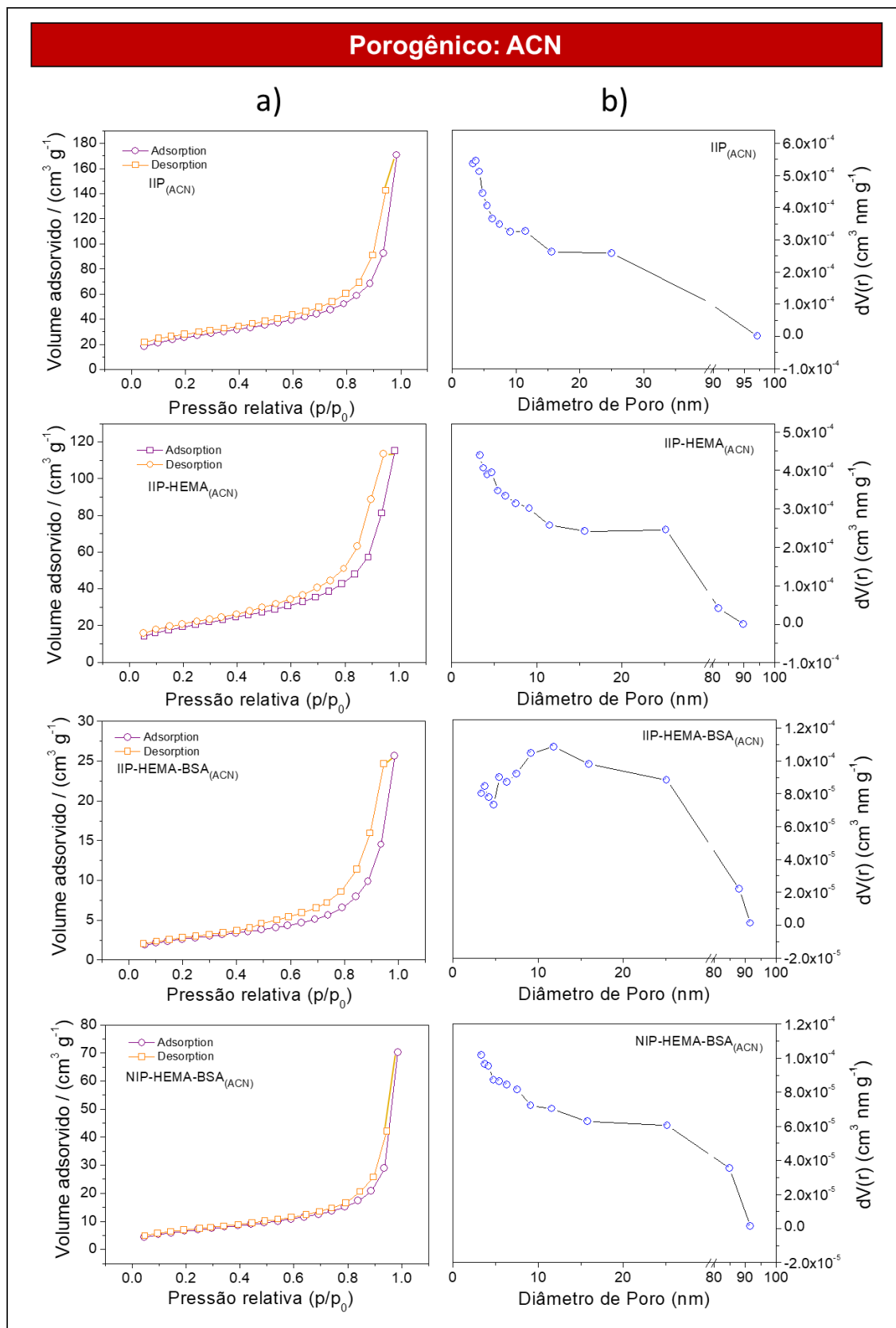
poliméricas ocorrem nos núcleos. Assim, as partículas continuam agregando-se devido às interações entre o co-monômero, monômero e o EGDMA mediante ligações de hidrogênio [197]. Como resultado da agregação e maior tamanho, as partículas apresentam menor área superficial e há menor formação de interstícios na estrutura polimérica. Após a imobilização da BSA na superfície dos polímeros sintetizados em ACN, ocorre uma diminuição significativa da área superficial uma vez que a BSA pode obstruir os poros. De igual forma, a presença da BSA na superfície produz maior agregação das partículas poliméricas devido à diversas interações intermoleculares entre a BSA e a matriz polimérica, resultando maior interconexão das cadeias poliméricas, como foi observado no perfil de decomposição térmica (Figura 25) e, conseqüentemente, menor área superficial.

Em relação ao polímero sintetizado em EtOH, foi observado um comportamento diferente, porque a adição do HEMA e o revestimento com BSA produziu um aumento na área superficial e no volume de poros [198]. Este fato é devido à maior interação entre o HEMA e EtOH, tornando a interação ATU-EtOH menos acentuada. Assim, sendo a interação ATU-EtOH fraca, faz com que ocorra maior evaporação do EtOH e, como consequência, haverá maior formação de poros e maior área superficial. A imobilização da BSA sobre a superfície do  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{EtOH})}$  confere maior tamanho às partículas poliméricas e maior área superficial quando comparado com os polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{EtOH})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{EtOH})}$ .

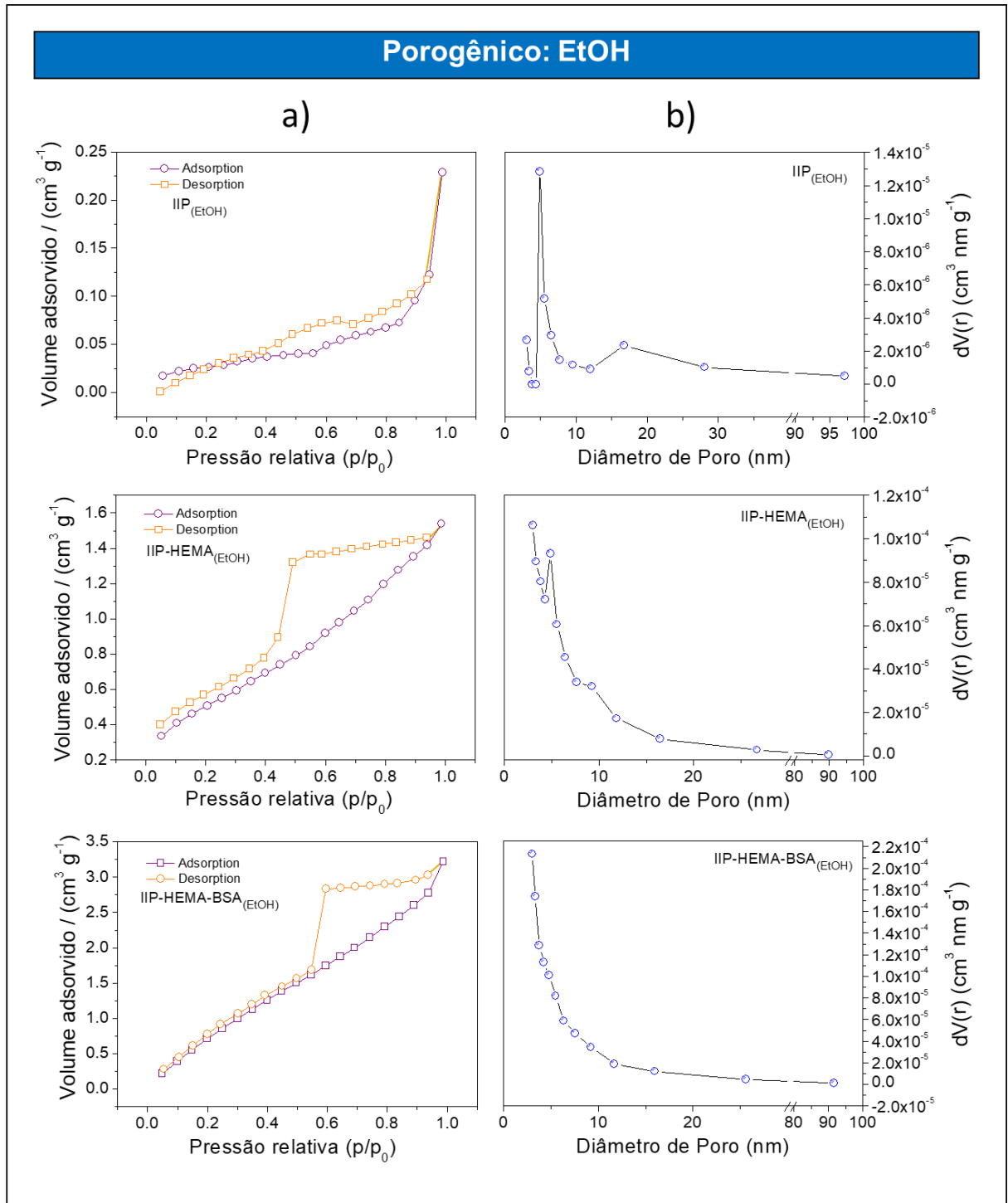
Na Tabela 1 pode-se ainda observar que área superficial dos polímeros isentos de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na matriz polimérica foi, como era de se esperar, superior aos polímeros contendo  $\text{Cu}^{2+}$ .

De acordo com os perfis das isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio obtidas para os polímeros (Figura 29a e 30a), todos os polímeros são classificados como materiais mesoporosos, uma vez que, a forma das isotermas é sigmóide do tipo IV com histerese H2 para os polímeros sintetizados em EtOH, enquanto, tipo V com histerese H3 para os polímeros sintetizados em ACN, que são perfis característicos de adsorventes mesoporosos, onde a adsorção na superfície sólida ocorre via adsorção multicamada seguida de condensação capilar [163].

**Figura 29.** (a) Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio e (b) distribuição de tamanho de poros estimada pelo método BJH para os polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN).



**Figura 30.** (a) Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio e (b) distribuição de tamanho de poros estimada pelo método BJH para os polímeros sintetizados em etanol (EtOH).



É importante salientar que os polímeros sintetizados em EtOH (Figura 30), os quais possuem uma histerese tipo H2, apresentam poros com estrutura complexa não definida, enquanto que os polímeros sintetizados em ACN (histerese tipo H3 – Figura 29) possuem poros em forma de fenda [161]. Da mesma forma, a partir da distribuição do tamanho dos poros (Figura 29b e 30b), obtida pelas curvas de adsorção, observou-se predominância de poros com diâmetro entre 3,05 e 28,12 nm. Estes valores permitem classificar os polímeros como mesoporosos de acordo com a classificação estabelecida pela IUPAC (2 a 50 nm) [199]

#### 5.2.4 Mapeamento e Distribuição Elementar

A Figura 31 apresenta os espectros EDS obtidos para os polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}_{(\text{ACN, EtOH})}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}_{(\text{ACN, EtOH})}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN, EtOH})}$ . Os espectros e o mapeamento elementar confirmaram a presença dos átomos Cu e S na matriz polimérica com valores percentuais (% em massa) cerca de 0,07-0,17% e 0,46-1,32%, respectivamente. Do mesmo modo, no mapeamento pode-se observar que a distribuição do átomo S (representado com pontos vermelhos) mostrou-se bastante homogênea e uniforme na superfície dos polímeros, sendo uma importante característica destes materiais para a aplicação em procedimentos de pré-concentração de Cu, devido à ligação estável entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e o S da ATU.

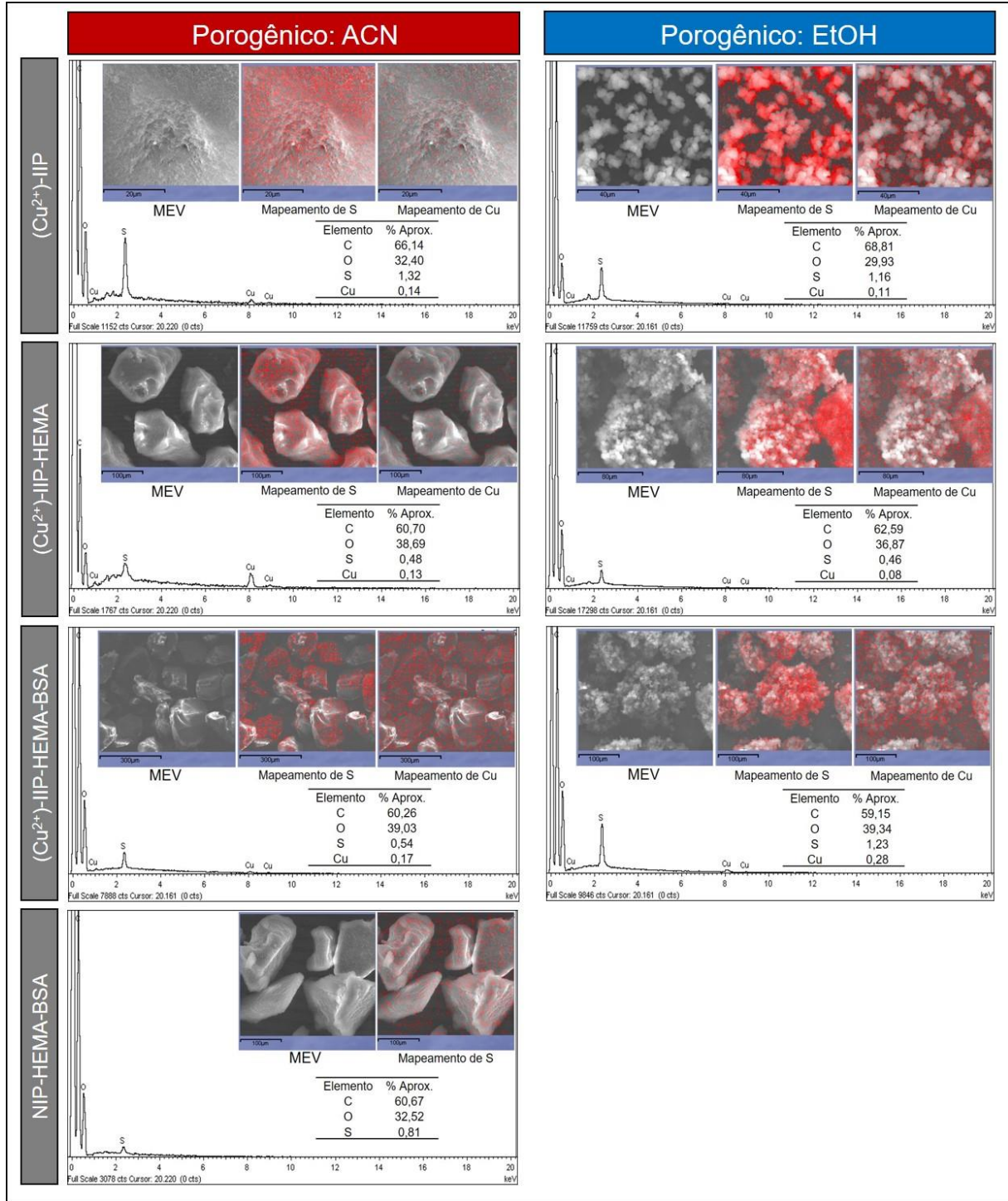
Cabe salientar que os teores de S apresentados na Figura 31 são próximos àqueles obtidos na análise elementar CHNS, confirmando desta forma a distribuição uniforme do S na rede polimérica.

#### 5.2.5 Análise Elementar CHNS

Considerando que os polímeros sintetizados em ACN proporcionaram maior porosidade e maior adsorção em relação aos íons de Cu, como será demonstrado nos estudos relativos ao efeito de pH na pré-concentração (Seção 5,3), a análise elementar de CHNS foi realizada somente para os polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $\text{NIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{NIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ . Estes polímeros também foram utilizados para avaliar o efeito de impressão química. Assim, foi determinada a porcentagem molar (mmol%) de monômero ATU, co-monômero HEMA e do reticulante EGDMA na cadeia polimérica por meio da análise elementar CHNS e do cálculo estequiométrico (Tabela 2), que foi muito útil para prever se a seletividade dos polímeros é atribuída ao efeito de impressão ou devido a quantidade molar de ATU.

Cabe salientar que a análise elemental não foi realizada para os polímeros IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> devido à diversidade de átomos que compõem a proteína BSA.

**Figura 31.** Imagens de MEV, mapeamento dos átomos de enxofre (S) e cobre (Cu), e espectro de energia dispersiva (EDS) dos polímeros sintetizados em acetonitrila (ACN) e etanol (EtOH).



**Tabela 2.** Determinação da % em mmol da ATU, EGDMA e HEMA nos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> a partir da análise elementar CHNS.

Polímeros	Composição (mmol %)					
	Inicial			Após a Polimerização		
	ATU	EGDMA	HEMA	ATU	EGDMA	HEMA
IIP <sub>(ACN)</sub>	20,00	80,00	-	15,38	84,62	-
NIP <sub>(ACN)</sub>	20,00	80,00	-	15,49	84,51	-
IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	16,67	66,66	16,67	13,13	68,94	17,92
NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	16,67	66,66	16,67	13,02	69,01	17,97

ATU: Aliltioureia; EGDMA: Dimetacrilato de Etilenoglicol; HEMA: 2-Hidroxietil Metacrilato.

Como pode ser observado na Tabela 2, após a polimerização, a porcentagem residual da ATU foi menor, obtendo-se uma taxa de conversão de 76,9%, 77,5%, 78,8% e 78,1% nos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> respectivamente, enquanto que, a taxa de conversão do reagente de ligação cruzada EGDMA nos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> foi maior, com valores de 105,8%, 105,6%, 103,4% e 103,5% respectivamente. Estes resultados permitem inferir que a presença do co-mônômero HEMA na síntese não teve influência significativa na taxa de conversão da ATU nem do EGDMA. Assim, a quantidade de ATU nos polímeros impressos [IIP<sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] e não impresso [NIP<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] foi muito semelhante, indicando que qualquer diferença na seletividade do polímero impresso deve ser atribuída aos sítios impressos.

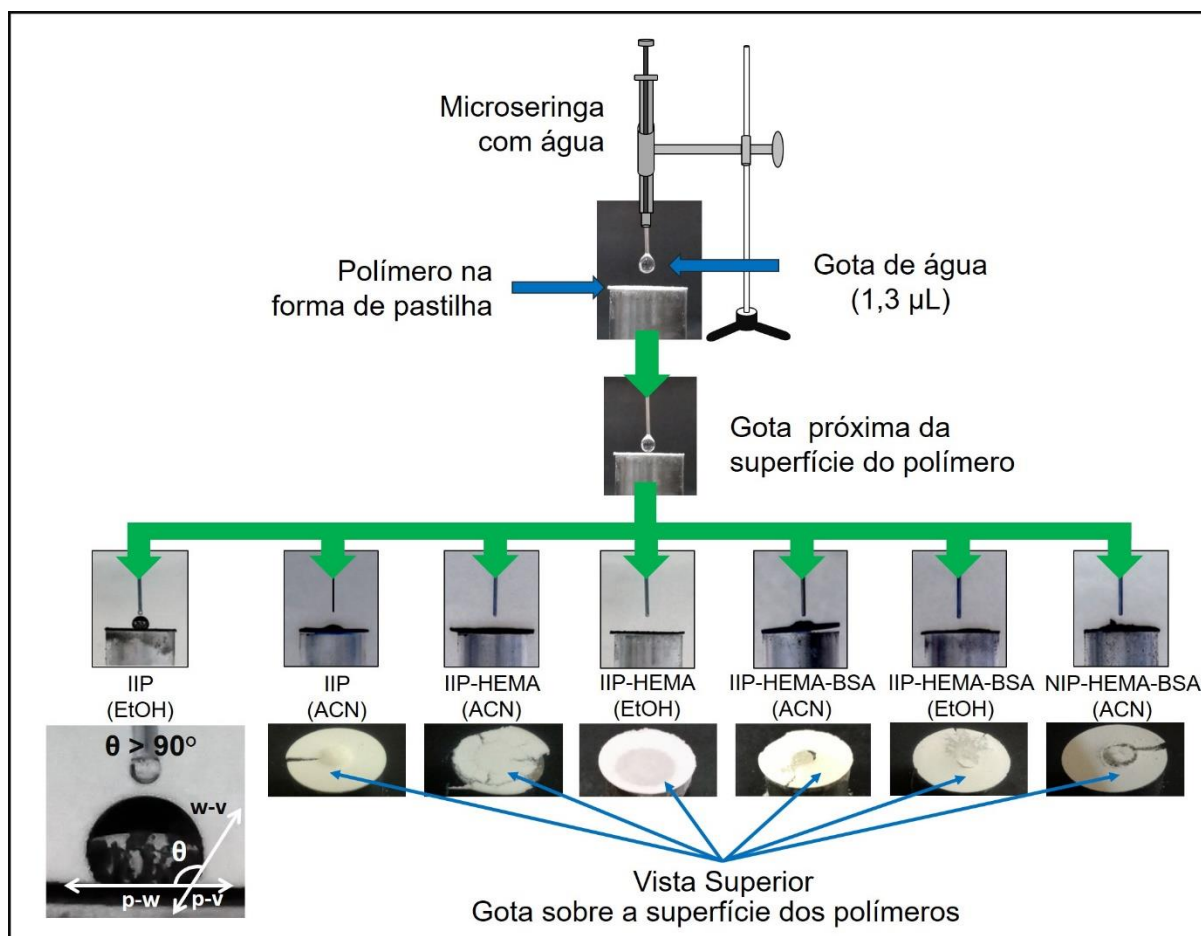
A porcentagem de enxofre (S) encontrada nos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> foi de 1,91%, 1,34%, 1,56% e 1,66%, respectivamente.

### 5.2.6 Hidrofilicidade/Hidrofobicidade

Com base no esquema apresentado na Figura 19 e os resultados do grau de molhabilidade, obtidos por meio da magnitude do ângulo de contato ( $\theta$ ) (Figura 32), foi possível constatar que os polímeros sintetizados apresentaram alta molhabilidade, uma vez que a gota de água se expandiu sobre a superfície dos polímeros (ângulo de contato igual a 0° ou inferior a 90°), permitindo classificar estes materiais como hidrofílicos, com exceção do polímero IIP<sub>(EtOH)</sub>.

No caso dos polímeros hidrofílicos, as forças de adesão polímero-água são mais fortes do que as forças coesivas entre as moléculas de água e entre as partículas do polímero, provocando o espalhamento espontâneo (molhamento completo) quando a gota interage com a superfície do polímero.

**Figura 32.** Fotografias (plano transversal) da gota de água estática sobre a superfície dos polímeros compactados na forma de disco. Interfaces: polímero-água (p-w), polímero-vapor (p-v) e água-vapor (w-v).



A presença do co-mônômero hidrofílico HEMA nos polímeros IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub>, como era esperado, aumentou o caráter hidrofílico da superfície dos polímeros, aumentando assim as forças de adesão entre a superfície do polímero e a água.

Por outro lado, foi observado que a gota de água não se espalhou completamente na superfície dos polímeros IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, fato que pode ser atribuído à baixa área superficial e ao menor volume de poro que apresentam estes polímeros, pela presença da BSA como camada externa. Além disso, observou-se que, quando a gota de água entra em contato com a superfície do IIP<sub>(ACN)</sub> ocorre uma rápida desintegração da superfície devido à forte interação polímero-água, que é favorecida pela presença de superfícies rugosas [164,200], e as partículas do polímero IIP<sub>(ACN)</sub> se movem para o interior da gota de água.

A afinidade destas matérias pela água também foi observada no perfil de estabilidade térmica (30 - 85 °C) e no espectro infravermelho (bandas 3725 - 3080 cm<sup>-1</sup>).

Com relação ao polímero IIP<sub>(EtOH)</sub>, este não apresentou afinidade pela água (hidrofóbico), uma vez que, o ângulo formado pela intersecção entre a tangente da interface polímero-água e a tangente da interface água-vapor foi maior que 90°. Este comportamento pode ser atribuído aos dados texturais e as características morfológicas desse polímero [200,201], uma vez que as superfícies não rugosas (lisas) e não porosas, com baixa área superficial, são características de materiais hidrofóbicos [164,165]. A reduzida hidrofiliidade deste material também foi comprovada pela análise termogravimétrica (TGA).

A hidrofiliidade dos polímeros também foi avaliada mediante o estudo de efeito *swelling* (inchamento). Na Tabela 3 são mostradas as porcentagens de teor de água de equilíbrio (%TAE). Nessa tabela é possível constatar que os resultados são análogos àqueles obtidos no estudo de ângulo de contato, uma vez que o caráter hidrofílico aumenta em materiais com superfícies rugosas (porogênico: ACN) e com a presença do HEMA, enquanto diminuem com a presença de BSA na superfície (menor porosidade) e em materiais com superfície não rugosas (porogênico: EtOH).

**Tabela 3.** Caráter hidrofílico dos polímeros expressado como porcentagem de teor de água em equilíbrio (%TAE) em pH 6,80. Os dados são apresentados como médias  $n = 3 \pm DP$ .

Polímeros	(%TAE)	
	ACN	EtOH
IIP	354,6 ± 3,9	37,7 ± 1,9
IIP-HEMA	265,6 ± 2,3	73,0 ± 2,0
IIP-HEMA-BSA	136,0 ± 2,4	55,7 ± 2,4
NIP-HEMA-BSA	138,9 ± 3,6	-

ACN: Acetonitrila; EtOH: Etanol.

Portanto, pode-se concluir que os polímeros sintetizados em ACN são hidrofílicos e exibem capacidade de inchaço muito maior (%TAE > 100) em comparação com os polímeros sintetizados em EtOH. Este comportamento favorece o uso desses polímeros em processos de adsorção-dessorção para íons metálicos, uma vez que a eficiência de um polímero, como material adsorvente, depende da maior acessibilidade dos íons metálicos aos grupos funcionais ativos e ancorados, e

por sua vez, essa acessibilidade está influenciada pela extensão do inchamento [166,202,203]. No entanto, a molhabilidade e o inchamento (efeito *swelling*) dos polímeros deve ter um limite para evitar pressões elevadas nas minicolumnas empacotadas com esses materiais, quando empregados em SPE.

Cabe salientar que a minicolumna contendo o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> não apresentou problemas de vazamento durante a execução dos experimentos, mostrados ao longo da Tese.

### 5.2.7 Ponto de Carga Zero (PCZ)

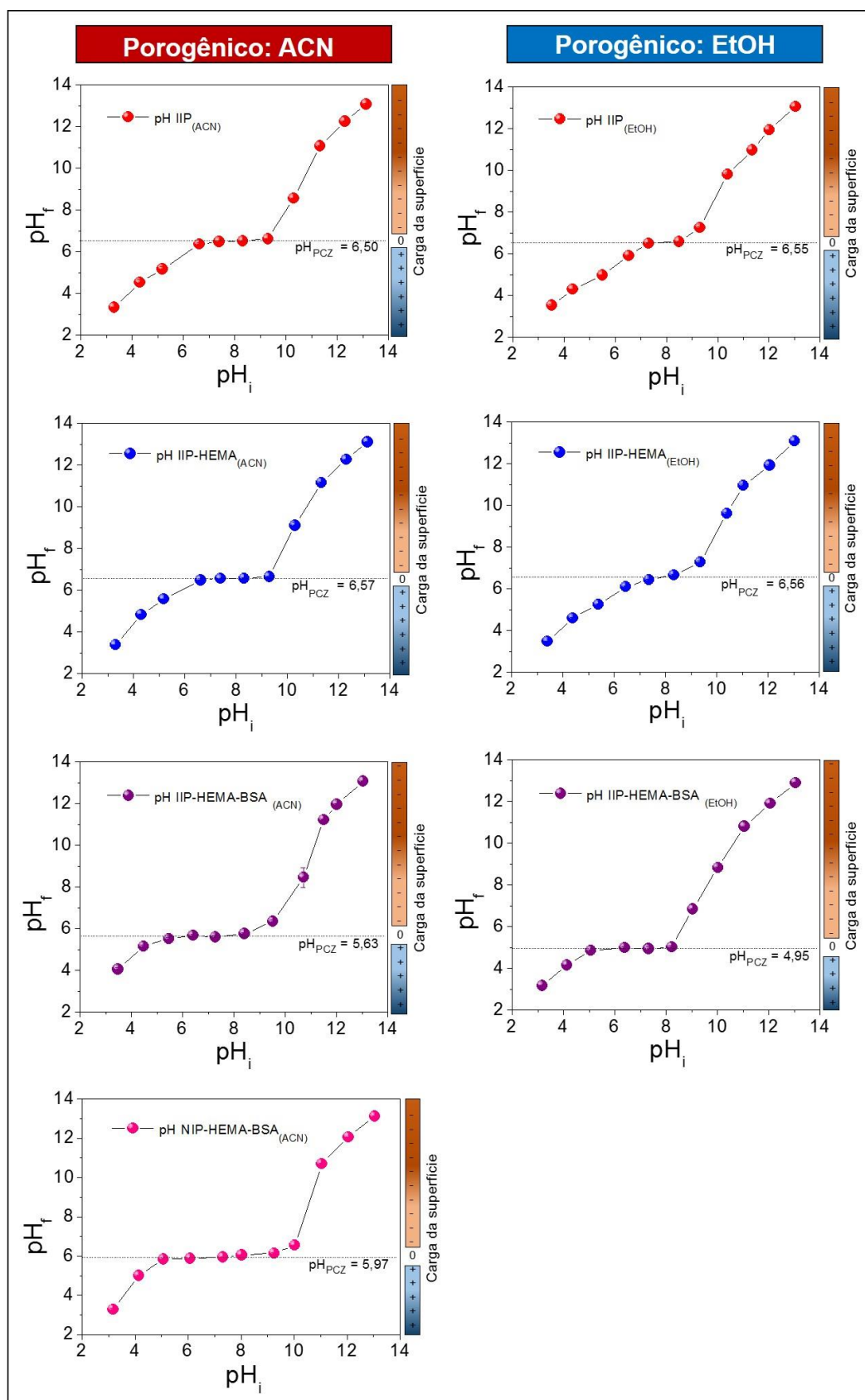
A superfície dos polímeros pode ser polarizável positivamente ou negativamente dependendo do pH. O pH no qual as cargas positivas e negativas estão em equilíbrio, ou seja, em que a superfície tem carga neutra ou zero (0), é denominado ponto de carga zero (PCZ).

Na Figura 33, o diagrama da direita de cada gráfico representa a carga (positiva ou negativa) da superfície dos polímeros com base no aumento ou diminuição do valor de pH. A intensidade da cor representa a quantidade de carga. O zero (0) é o equilíbrio das cargas positivas e negativas, resultando uma superfície com carga neutra.

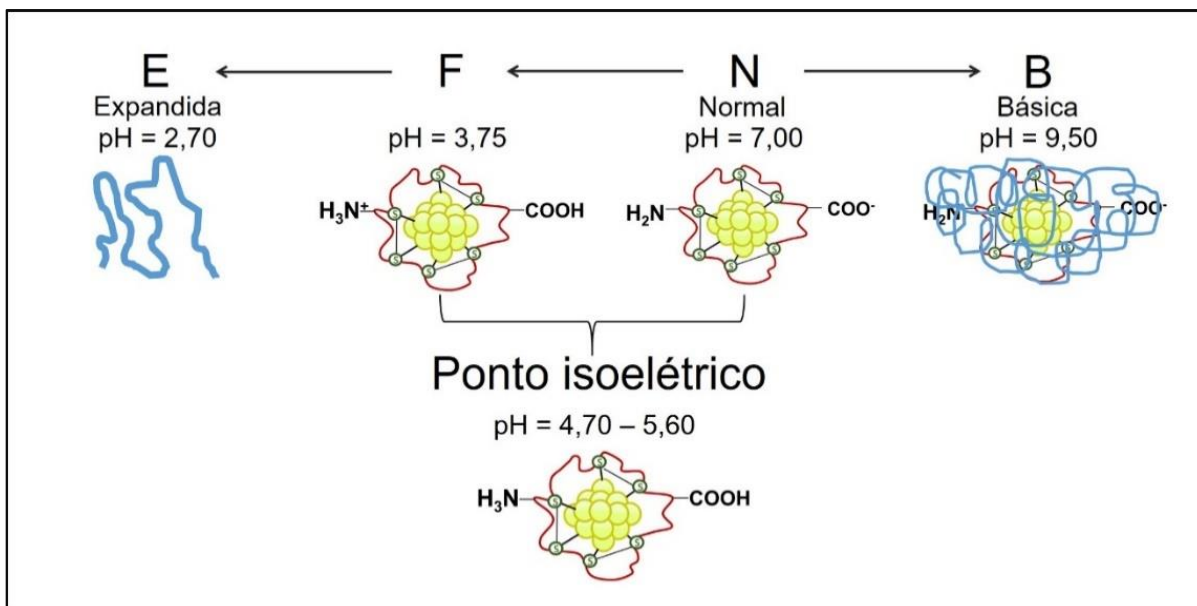
De acordo com os resultados expostos na Figura 33, o pH<sub>PCZ</sub> dos polímeros IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub> e IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub> é de 6,50 a 6,57, enquanto que para IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, o pH<sub>PCZ</sub> é 4,95, 5,63 e 5,97, respectivamente. Dessa forma, abaixo do valor do pH<sub>PCZ</sub>, a superfície dos polímeros adquire carga positiva, enquanto, em maiores valores do pH<sub>PCZ</sub>, a superfície encontrasse com carga negativa, devido à troca dos íons H<sup>+</sup> e <sup>-</sup>OH, respectivamente, entre a superfície do polímero e o meio.

Os valores de pH<sub>PCZ</sub> dos polímeros IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> confirmam a presença de BSA nos polímeros como camada externa, uma vez que esses valores estão próximos ao valor do ponto isoelétrico (PIE) da proteína BSA (pH<sub>PIE</sub> = 4,70-5,60) [143,144, 204-207]. Assim, a carga superficial do IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> dependem principalmente da BSA e de suas diferentes estruturas conformacionais, que também variam segundo o valor de pH.

**Figura 33.** Determinação do  $pH_{PCZ}$  dos polímeros em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl ( $pH_i$ : valor de pH inicial;  $pH_f$ : valor de pH final). Cada ponto de pH corresponde à média  $n=3 \pm \text{DP}$ .



**Figura 34.** Mudanças conformacionais da estrutura da BSA em função do pH.



Fonte: o próprio autor

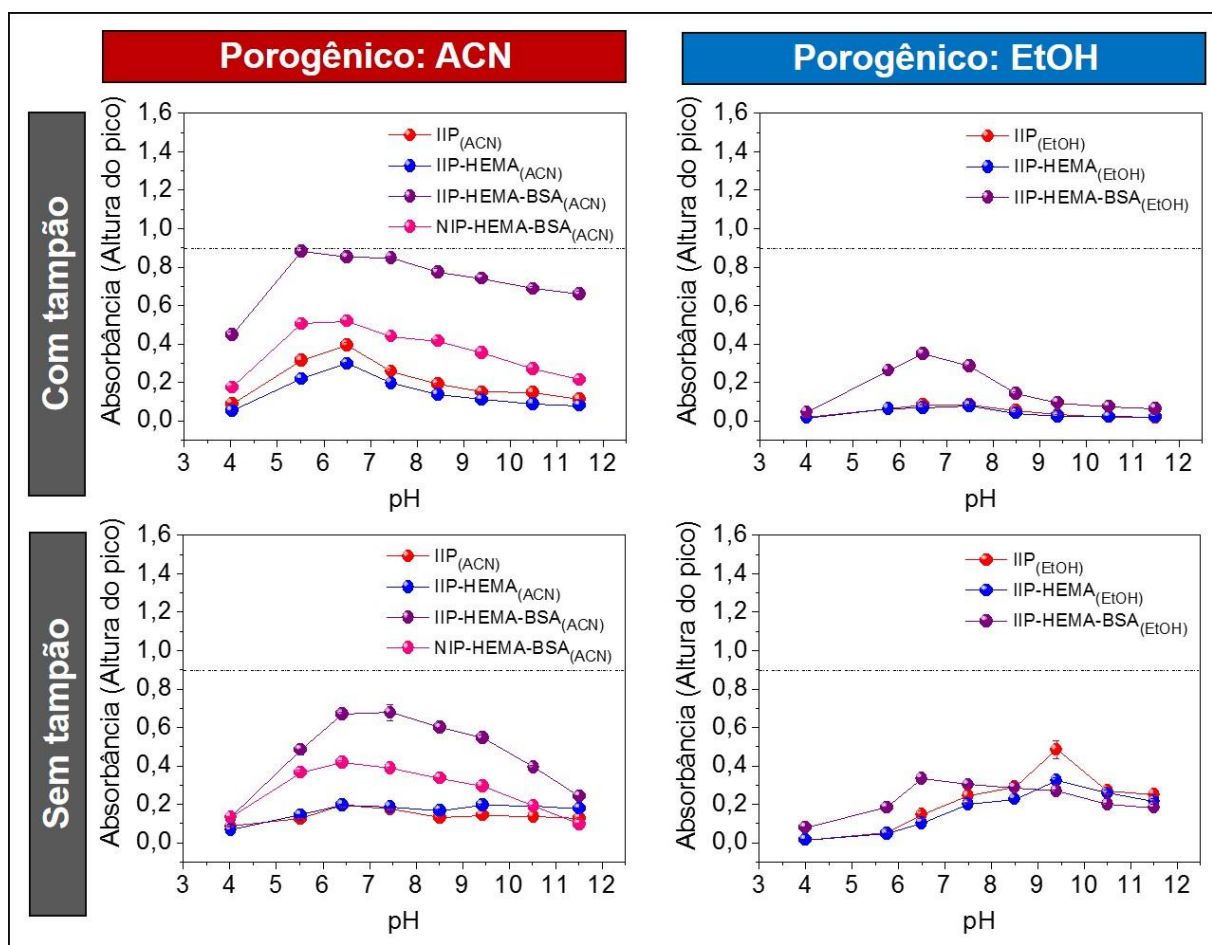
A carga positiva da BSA em valores de pH na faixa de 2,70-3,75 e 3,75-4,50 é devido às transições  $F \rightarrow E$  e  $N \rightarrow F$ , respectivamente (Figura 34) [207,208]. Portanto, em baixos valores de pH, a BSA sofre expansão na sua estrutura, expondo seus grupos funcionais na superfície com predomínio das pontes de dissulfeto e grupos amino, enquanto que na faixa de pH entre 5,60 e 7,00, a carga negativa está associada com a desprotonação do grupo carboxílico (Transição  $F \rightarrow N$ ) [206-207]. Portanto, a compreensão das diversas formas da BSA em função do pH é de grande importância ao estabelecer os locais de ligação da BSA com metais ou com outras moléculas, uma vez que algumas ligações estão expostas e outras protegidas pela mesma conformação estrutural da proteína.

### 5.3 EFEITO DO PH

O potencial hidrogeniônico (pH) é considerado um parâmetro importante no processo de adsorção, uma vez que mudanças de pH afetam a especiação de íons metálicos e a dissociação de grupos funcionais nos locais ativos da superfície do adsorvente e, conseqüentemente, a interação entre o íon metálico e o polímero [208].

Na Figura 35 é apresentado o efeito do pH sobre o sinal de absorvância dos íons  $Cu^{2+}$ , usando os polímeros como materiais adsorventes em sistema FIA-F AAS.

**Figura 35.** Efeito do pH sobre o sinal analítico (absorbância) dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  usando os polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  em sistema de pré-concentração por análise por injeção em fluxo.



Condições: massa do polímero: 50,0 mg; concentração de  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ; volume de pré-concentração: 20,0 mL; vazão de pré-concentração/eluição:  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; concentração do tampão:  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,00 e 5,75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ ; pH 6,50 =  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ; 7,45 - 9,40 =  $\text{Tris}/\text{Tris-HCl}$ ; 10,50 e 11,50 =  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ); Eluente:  $\text{HCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ .

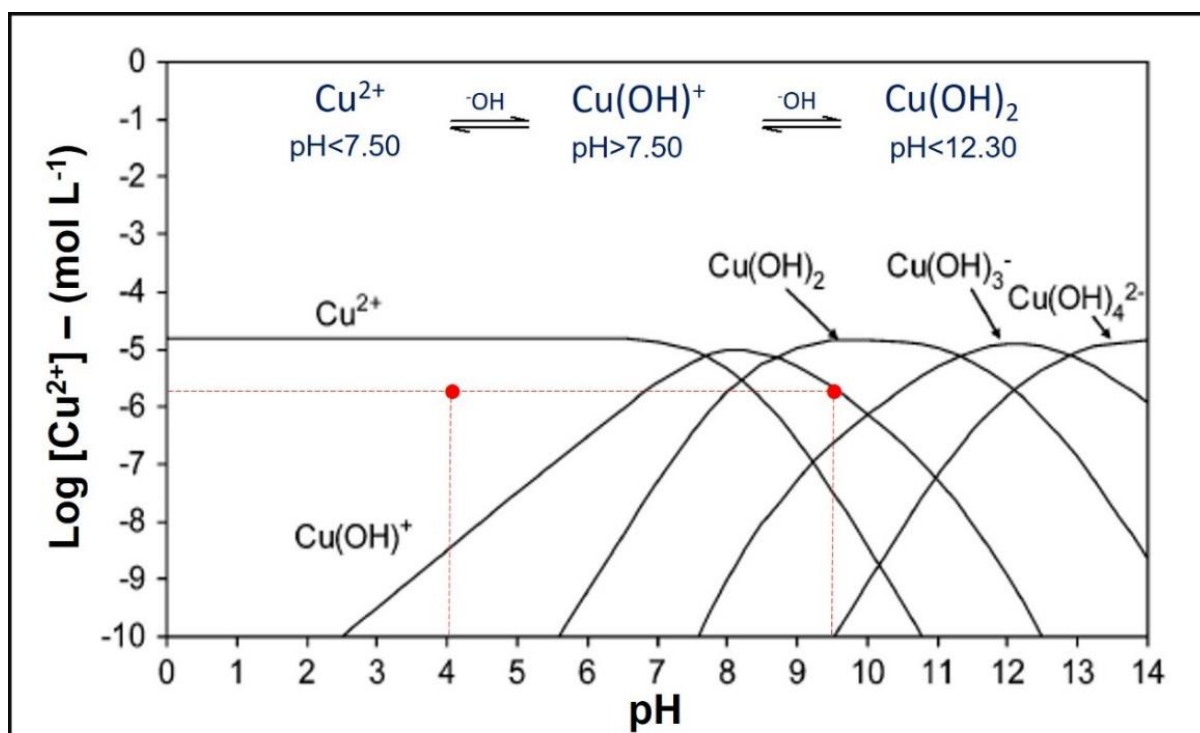
Os resultados deste estudo indicam que o pH e o tampão têm forte influência na adsorção do íon  $\text{Cu}^{2+}$  nos polímeros, refletindo proporcionalmente no sinal de absorbância. A baixa adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com os polímeros sintetizados em EtOH pode ser atribuída a sua baixa área superficial, menor volume de poro e menor hidrofiliabilidade (efeito *swelling*), que são condições desfavoráveis para a adsorção dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  nos sítios de ligações ancorados nos polímeros. Além disso, observou-se uma diminuição significativa no sinal do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na presença da solução tampão, possivelmente devido à forte interação entre íons  $\text{Cu}^{2+}$  e o ânion do tampão ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Tris-HCl}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) e não com as partículas poliméricas do  $\text{IIP}_{(\text{EtOH})}$  e  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{EtOH})}$ , conforme esperado, tornando mais difícil a difusão do metal para os locais de ligação,

especificamente porque a porosidade dos polímeros sintetizados em EtOH é muito menor que os sintetizados em ACN.

Por outro lado, o sinal de absorvância obtido com os polímeros sintetizados em ACN foi maior na presença da solução tampão. Este comportamento provavelmente pode ser atribuído à capacidade tamponante da solução tampão que proporciona melhor estabilidade do pH durante a pré-concentração, favorecendo a interação  $\text{Cu}^{2+}$ -ATU nos polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ , uma vez que na ausência da solução tampão há variação do pH especificamente em 6,50 e 7,50.

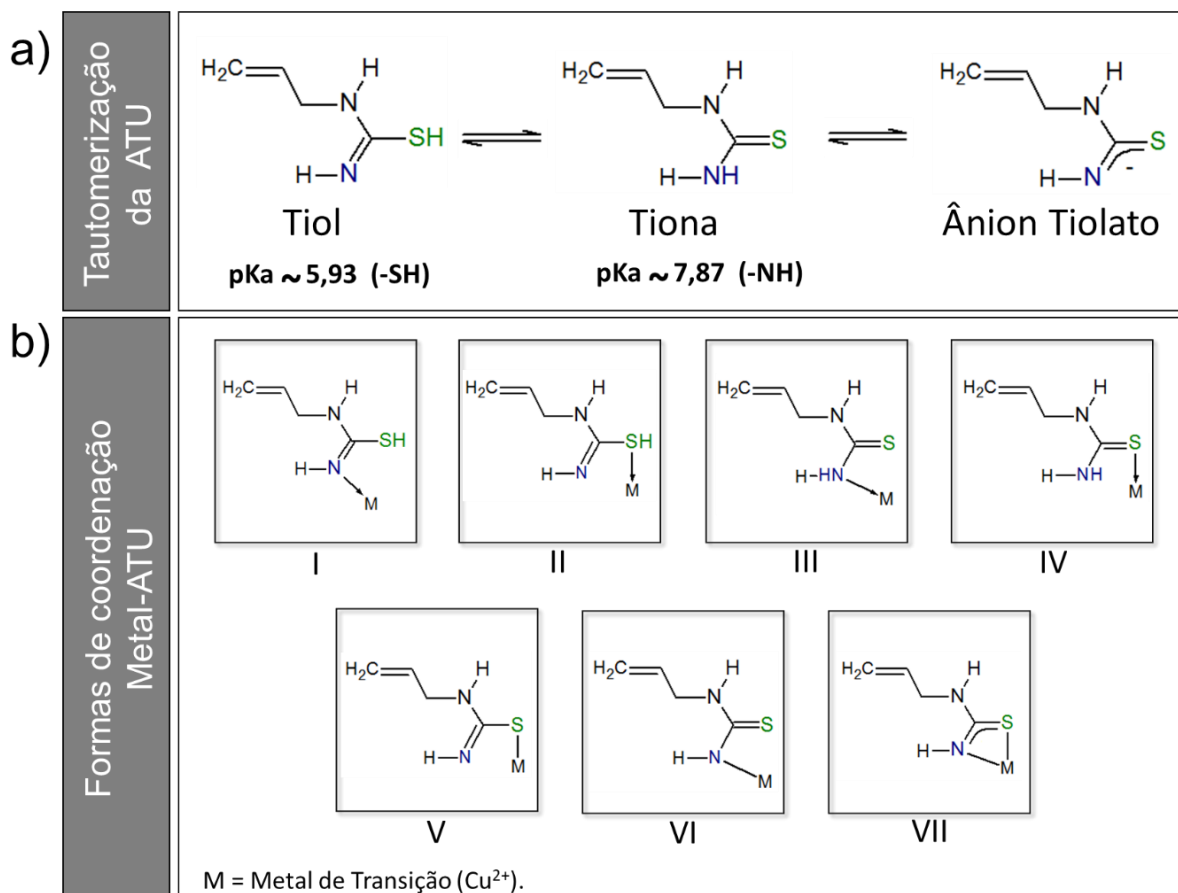
Foi observado que ao pré-concentrar o íon  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando os polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ , o sinal de absorvância do íon  $\text{Cu}^{2+}$  aumentou quando o pH incrementou de 4,00 para 6,50 e depois diminuiu com o aumento do pH de 7,00 para 11,50 na presença da solução tampão, enquanto que, na ausência de tampão, o sinal de absorvância foi constante na faixa de pH de 7,00 a 11,50. A diferença entre os sinais de absorvância nos diferentes valores de pH pode ser explicada pela disponibilidade do Cu (Figura 36) nas respectivas soluções e ao equilíbrio tautomérico da ATU (Figura 37a).

**Figura 36.** Especificação teórica do Cu na forma de hidroxocomplexos em água pura. ( $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  do íon  $\text{Cu}^{2+}$  é equivalente a  $1,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ).



Fonte: Adaptada da referência [209]

**Figura 37.** a) Formas tautoméricas da ATU, e b) Diversas formas de coordenação entre a ATU e o metal de transição ( $M = Cu^{2+}$ )



**Fonte:** Adaptada da referência [210,211]

A Figura 36 mostra que em baixas concentrações de Cu, o íon  $Cu^{2+}$  ou  $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$  é a espécie dominante em valores de pH abaixo de 7,50. Em meio básico e em concentrações baixas o Cu começa a formar o primeiro hidroxocomplexo que corresponde ao  $Cu(OH)^+$ . Em valores de pH mais elevados, até 12,30, a espécie dominante é o hidróxido de Cu  $[Cu(OH)_2]$ . Já em concentrações mais elevadas de Cu, acima do produto de solubilidade ( $K_{ps} = 4,8 \times 10^{-20}$ ), o  $Cu(OH)_2$  começa a precipitar. Acima de pH 12,30 o Cu forma os hidroxocomplexos  $Cu(OH)_3^-$  e  $Cu(OH)_4^{2-}$ .

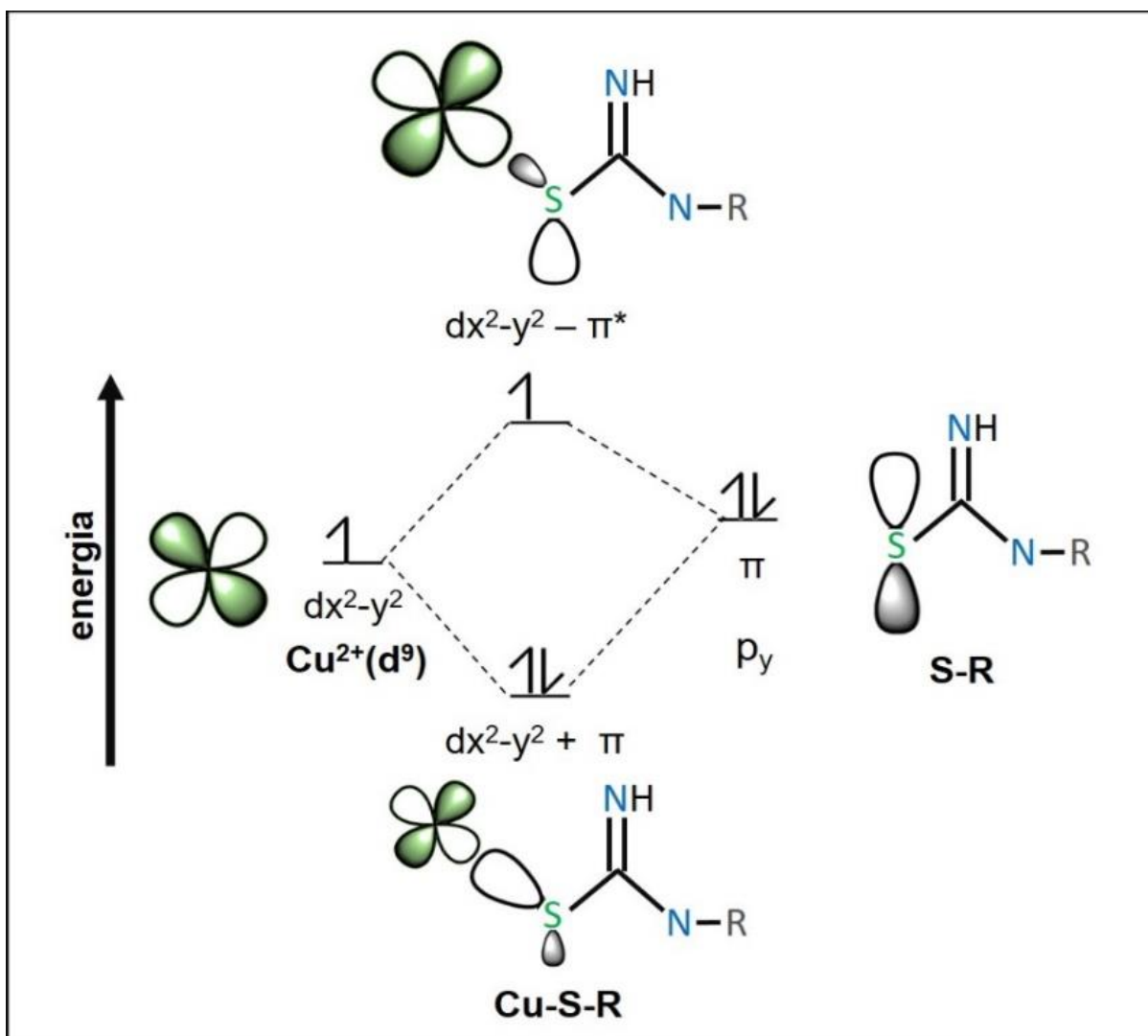
Cabe salientar que a ATU pode coordenar com os metais de transição de diversas formas (Figura 37b) mediante o átomo de nitrogênio e/ou enxofre [188, 210]. A ligação entre a ATU e o metal pode ser representada por meio da estrutura na forma de tiol (Figura 37b I e II) ou na forma de tiona (Figura 37b III e IV). No entanto, dependendo das condições de reação, a ATU pode estar na forma aniônica (desprotonada), apresentando maior interação com o metal mediante as estruturas V, VI ou VII, apresentadas da Figura 37b.

Com base na literatura, existe maior probabilidade que a coordenação entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e a ATU ocorra por meio do átomo de enxofre [158,187] devido à ligação estável entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  (ácido intermediário) e o átomo de enxofre (base mole) conforme o princípio de HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) [100,212]. Portanto, em meio ácido, a interação Cu-ATU é menor, uma vez que, os sítios de ligação da ATU (forma de Tiol) estão protonados. Em pH 6,50, próximo do  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  do IIP<sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, a coordenação de Cu-enxofre é favorecida, pois os átomos de enxofre da ATU (forma de tiona) possuem um par de elétrons disponível que pode ser doado (HOMO: highest-energy occupied molecular orbital) para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  (LUMO: lowest-energy unoccupied molecular orbital), formando uma ligação estável (Figura 38) [5], e obtendo como resultado maior adsorção de Cu nos polímeros. Acima do pH 6,55, a superfície dos polímeros adquire carga negativa, segundo o estudo  $\text{pH}_{\text{PZC}}$ , em que a interação com os íons  $\text{Cu}^{2+}$  é por meio de forças eletrostáticas.

Em baixas concentrações e  $\text{pH} > 7,50$  o sinal de absorvância foi menor devido à formação do complexo de hidróxido de Cu [ $\text{Cu}(\text{OH})^+$ ], que não favorece a interação com o átomo de enxofre pelo tamanho dos sítios de ligação (cavidades) criados durante a impressão química. Em valores de pH ainda mais alcalinos a adsorção diminui devido à precipitação dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  na forma de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

É oportuno mencionar que, o maior sinal analítico do Cu foi obtido com os polímeros IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em pH 5,50 (próximo do PIE da BSA) na presença de tampão, devido à mudanças conformacionais (transição do isômero N→F) nas estruturas secundárias e terciárias da BSA, induzidas pela força iônica, com exposição das pontes dissulfeto (Figura 34) [207,213]. Este fato possibilita maiores sítios de interação com o Cu e, conseqüentemente, o sinal de absorvância é maior.

**Figura 38.** Esquema de diagrama de níveis de energia do orbital molecular com distorção tetragonal (alongamento axial) para o complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -ATU.



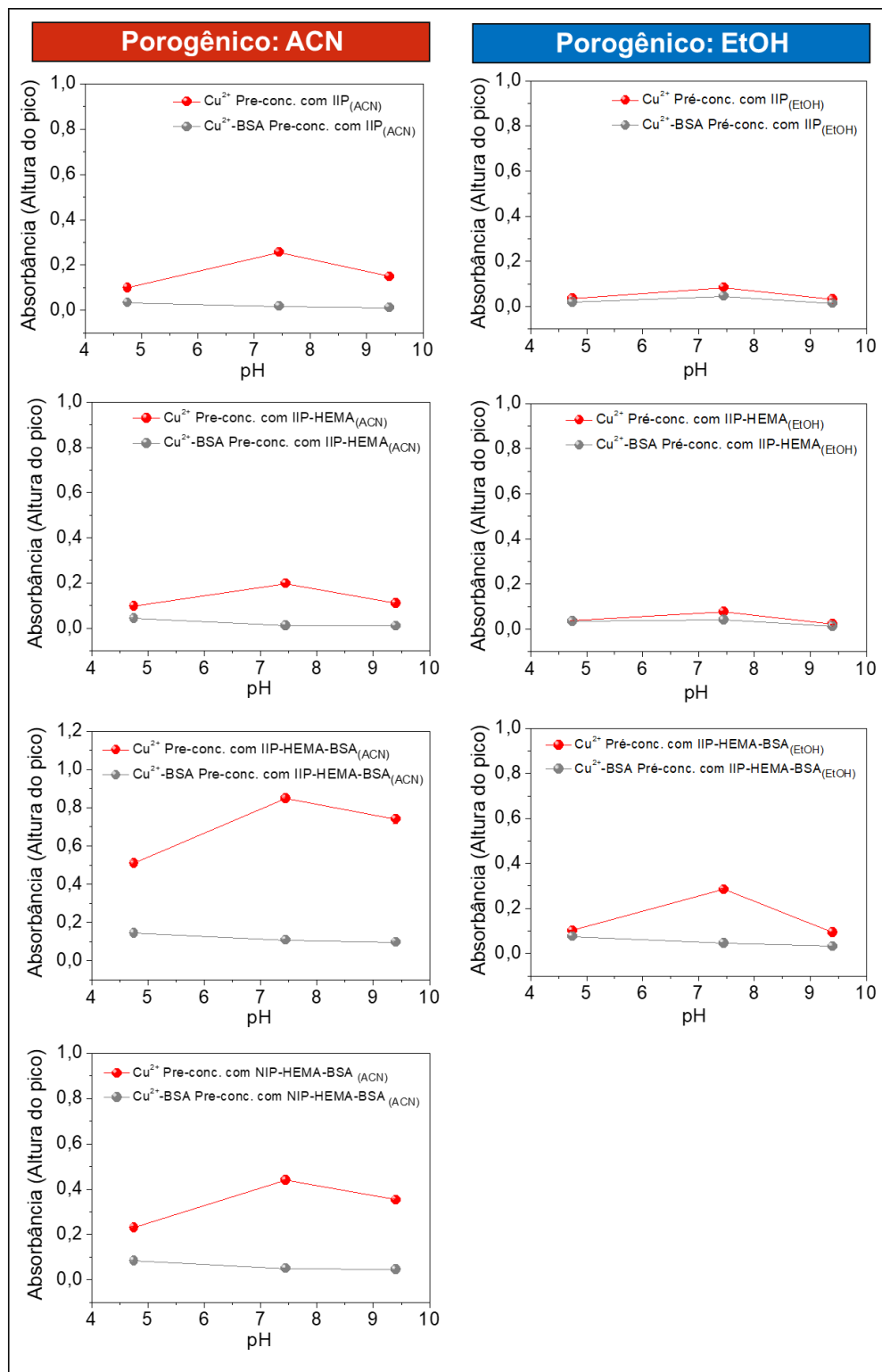
Fonte: Adaptada das referências [214-216]

#### 5.4 ESTUDO EXCLUSÃO DE PROTEÍNA

A pré-concentração do Cu também foi realizada na presença de BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>). Da mesma forma que no estudo de pH, uma solução de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) foi percolada pela minicolunas em valores de pH de 4,75, 7,45 e 9,40, na presença e ausência de tampão.

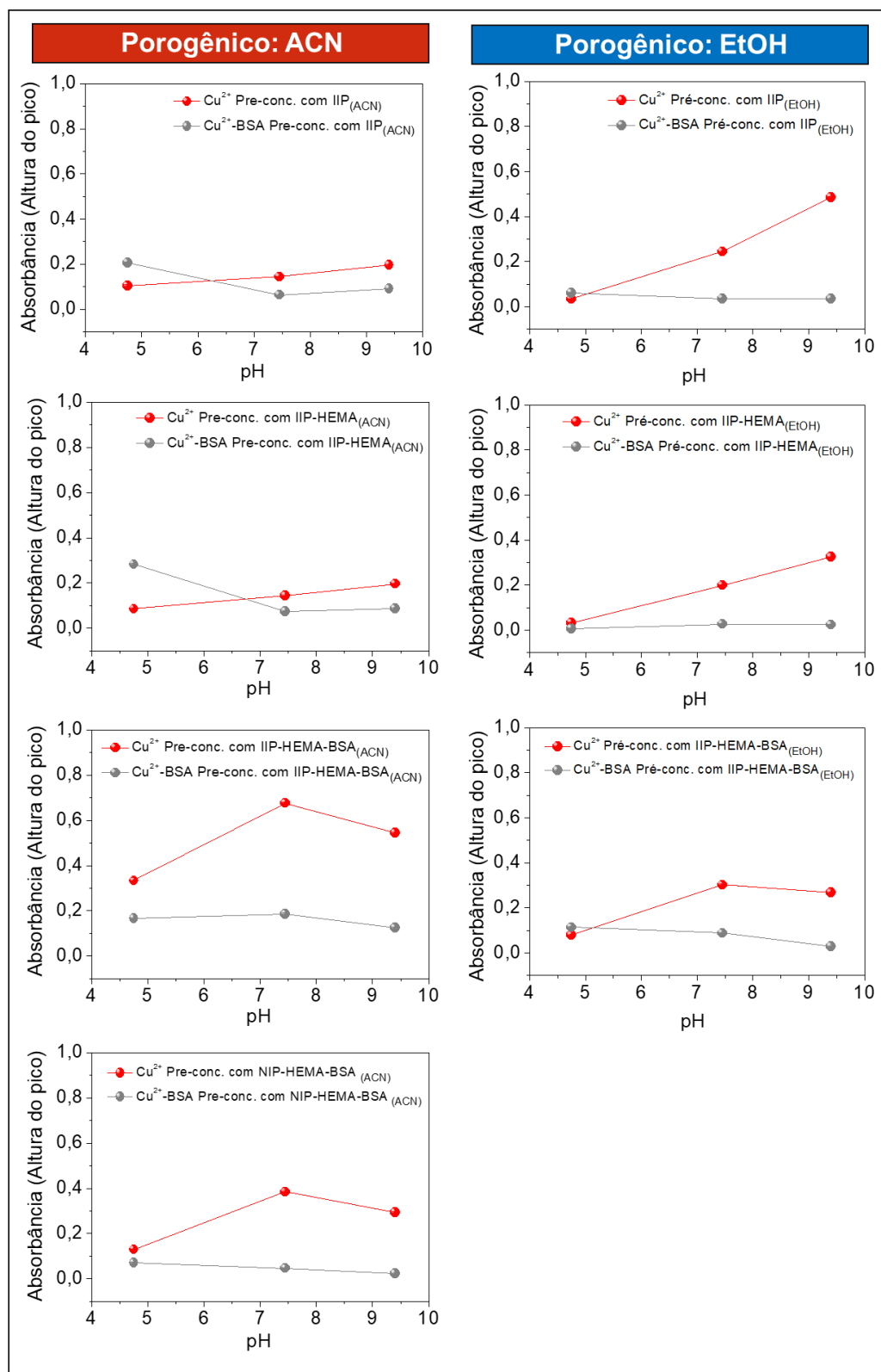
A partir dos resultados deste estudo, foi observado que a solução tamponante interferiu na pré-concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>), uma vez que menores sinais de absorvância foram obtidos na presença do tampão (Figura 39), quando comparado com os sinais obtidos na ausência do mesmo (Figura 40).

**Figura 39.** Efeito do pH sobre o sinal de absorvância do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de BSA em pH 4,75, 7,45 e 9,40, com tampão, utilizando os polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  em sistema de pré-concentração por análise de injeção em fluxo.



Condições: massa do polímero:  $50,0 \text{ mg}$ ; concentração de  $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ; volume de pré-concentração:  $20,0 \text{ mL}$ ; vazão de pré-concentração/eluição:  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; concentração do tampão:  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 7,45 - 9,40 =  $\text{Tris}/\text{Tris-HCl}$ ; Eluente:  $\text{HCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ . ( $\text{Cu}^{2+}$ -BSA= íons  $\text{Cu}^{2+}$  em solução com BSA).

**Figura 40.** Efeito do pH sobre o sinal de absorvância do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de BSA em pH 4,75, 7,45 e 9,40, sem tampão, utilizando os polímeros  $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  em sistema de pré-concentração por análise de injeção em fluxo.

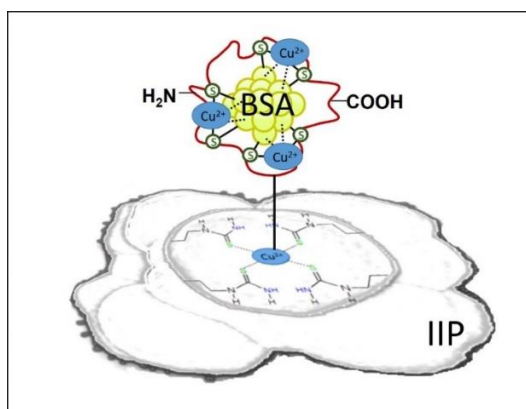


Condições: massa do polímero:  $50,0 \text{ mg}$ ; concentração de  $100,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ; volume de pré-concentração:  $20,0 \text{ mL}$ ; vazão de pré-concentração/eluição:  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Eluente:  $\text{HCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ . ( $\text{Cu}^{2+}$ -BSA: íons  $\text{Cu}^{2+}$  em solução com BSA).

Como observa-se na Figura 40, o sinal de absorvância de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>), de forma geral, diminuiu e/ou permaneceu constante com o aumento de pH de 7,45 a 9,40, devido à repulsão entre a carga negativa da superfície do adsorvente e a carga negativa da proteína BSA em solução (pH > PIE). Desta forma, o Cu ligado com a BSA em solução é excluído, resultando em um baixo sinal de absorvância.

Em pH 4,75, na ausência de tampão, obteve-se maior sinal de absorvância de Cu com a pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na presença de BSA [ $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>)] utilizando os polímeros IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>. Esse comportamento deve-se ao fato de que o Cu se coordena com a BSA por meio dos peptídeos N-terminais formando um complexo quadrado-planar e, ao mesmo tempo, interage com os grupos funcionais ativos da superfície do polímero, atuando como uma ponte entre o polímero e a BSA “polímero-Cu<sup>2+</sup>-BSA” (Figura 41). Contudo, a mesma molécula de BSA, em pH 4,75, pode interagir com outros íons  $\text{Cu}^{2+}$  mediante suas 17 ligações fracas de dissulfeto, causando aumento no sinal de absorvância de Cu [217].

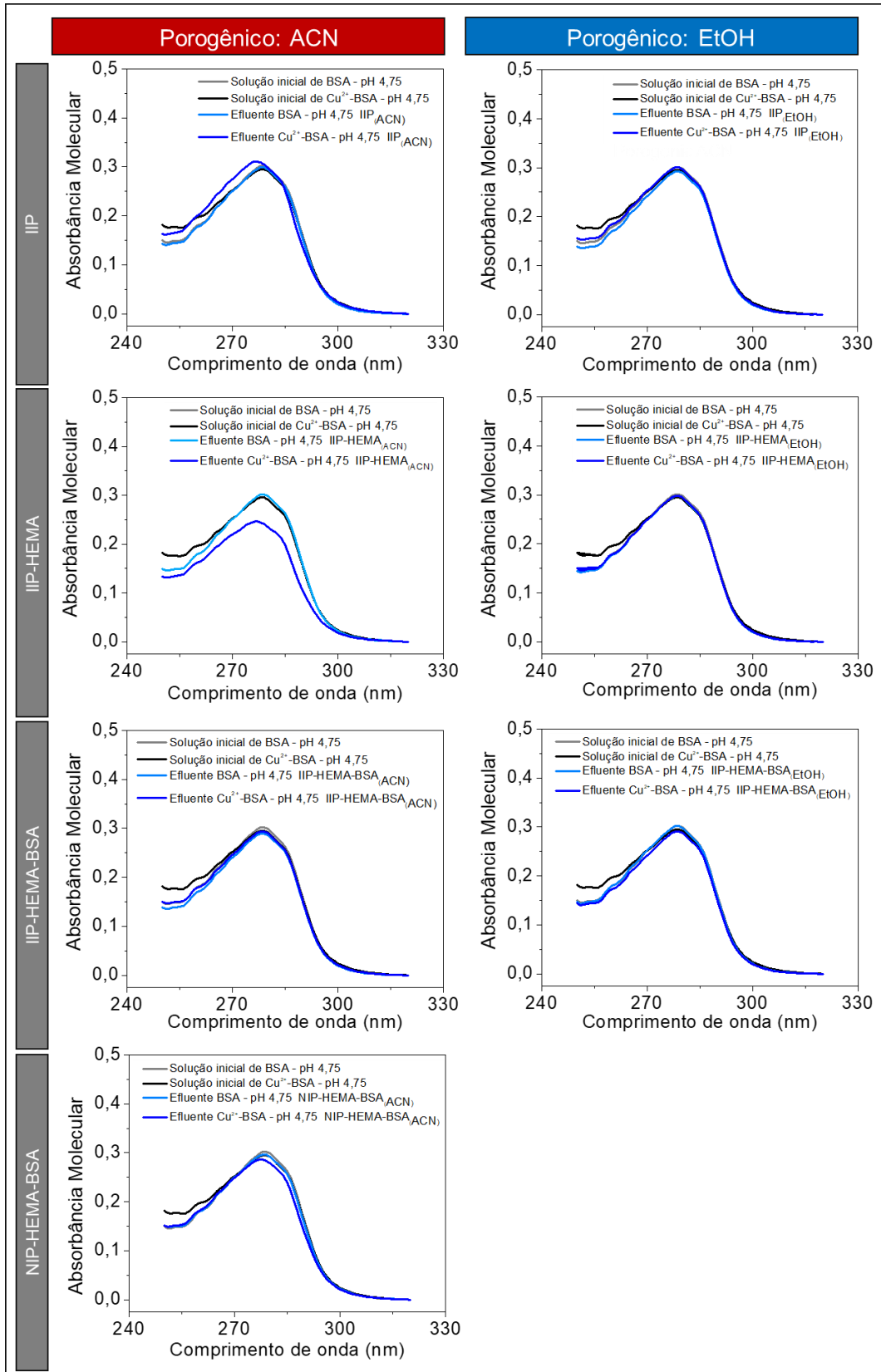
**Figura 41.** Representação esquemática do íon  $\text{Cu}^{2+}$  formando uma ponte entre o polímero e proteína BSA, e a mesma molécula de BSA ligada com outros íons  $\text{Cu}^{2+}$  mediante ligações fracas de dissulfeto.



Fonte: o próprio autor

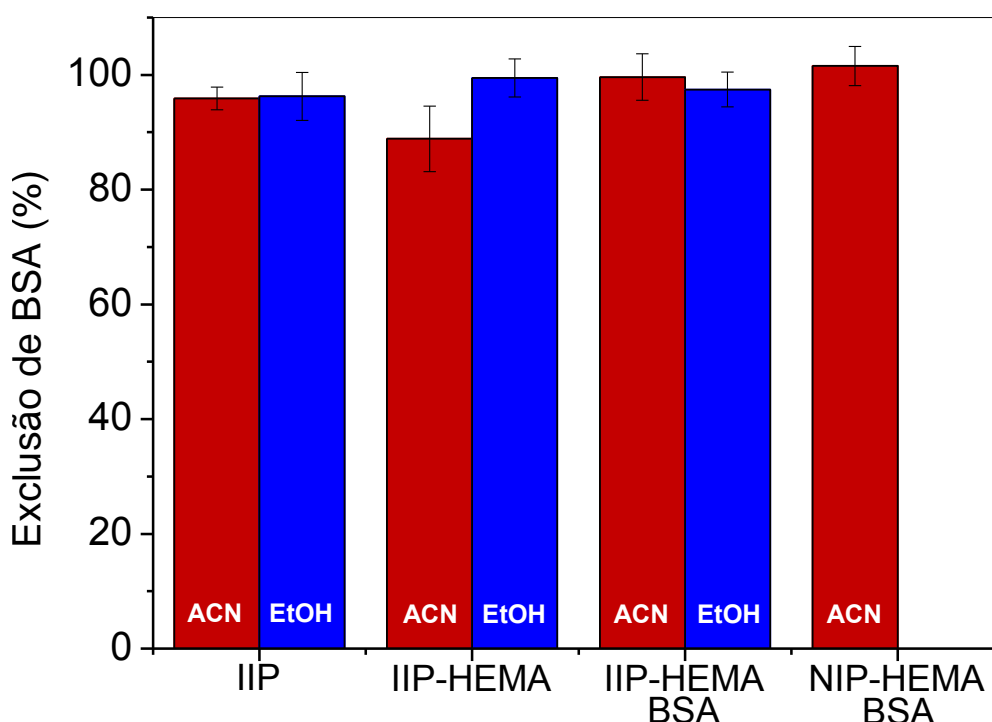
Para verificar a capacidade de exclusão da proteína BSA dos polímeros sintetizados, os efluentes da etapa de pré-concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA em pH 4,75, 7,45 e 9,40 foram analisados por UV-Vis em  $\lambda_{\text{máx}} = 278$  nm. Na Figura 42 são apresentados apenas os espectros dos efluentes  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) em pH 4,75, uma vez que, espectros similares foram obtidos em pH 7,45 e 9,40.

**Figura 42.** Espectros de absorção na região ultravioleta (240-330 nm) da solução de 0,5 g L<sup>-1</sup> BSA na ausência e presença de Cu (100,0 µg L<sup>-1</sup> de íons Cu<sup>2+</sup> em pH 4,75 sem tampão) e dos efluentes obtidos na etapa de pré-concentração utilizando os polímeros IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>.



Com base nos espectros apresentados na Figura 42, observa-se que todos os polímeros, com exceção do IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, conseguem excluir a proteína BSA, uma vez que os sinais de absorvância da solução de BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e Cu<sup>2+</sup>-BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) são similares aos sinais de absorvância dos respectivos efluentes. A partir do sinal máximo de absorvância em  $\lambda_{\text{máx}} = 278 \text{ nm}$ , das soluções iniciais e dos efluentes, foram calculadas as porcentagens de exclusão da BSA e apresentadas na Figura 43.

**Figura 43.** Exclusão da proteína BSA (%) utilizando os polímeros IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em pH 4,75 na ausência de tampão.



As porcentagens de exclusão da proteína BSA obtidas com os polímeros sintetizados em ACN e EtOH estão na faixa de 91,8% e 100,3%. As menores porcentagens foram obtidas com os polímeros que forneceram maior sinal de absorvância de Cu durante a etapa de pré-concentração de Cu<sup>2+</sup>-BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>). De fato, uma porção da proteína ficou ligada ao polímero por meio da ponte de Cu “polímero-Cu<sup>2+</sup>-BSA”, como foi mencionado anteriormente e ilustrado na Figura 31. Dessa forma, pode-se concluir que o mecanismo de exclusão da BSA em pH 4,75 ocorreu por barreira de difusão química devido às propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas da superfície dos polímeros e da BSA [53]. Assim, a água adsorvida na superfície dos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> e a água de hidratação da BSA (raio de Stokes = 3.39 nm)

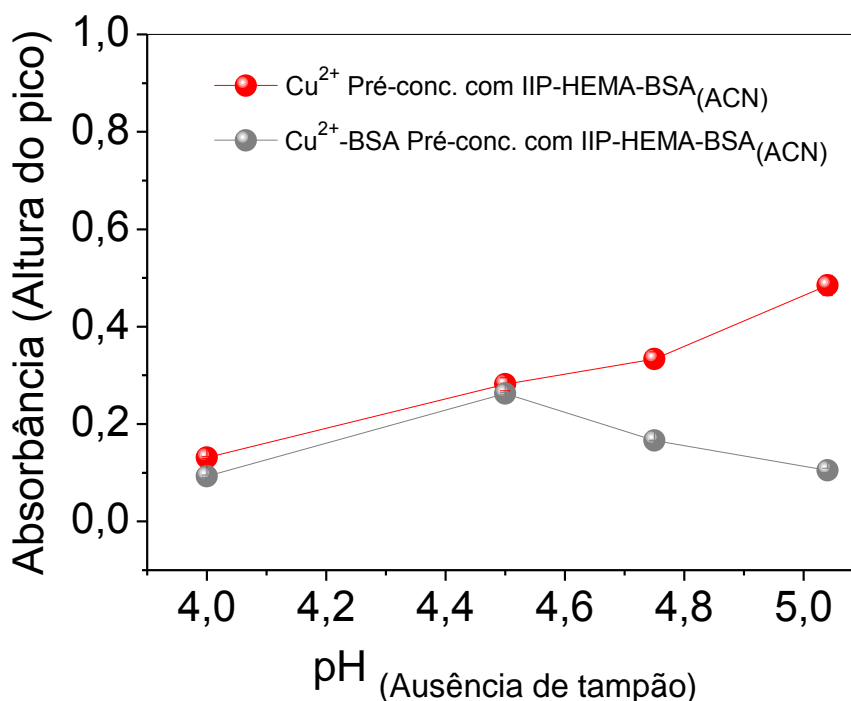
formam uma barreira hidrofílica [218], impedindo o acesso da proteína à matriz polimérica e permitindo a adsorção dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  aos sítios de interação do polímero [54].

Por outro lado, as porcentagens de exclusão da BSA obtidas em pH 7,45 e 9,40 foram acima de 98,0% e o mecanismo de exclusão ocorreu pela repulsão de cargas negativas formada em meio básico.

Embora a maioria dos polímeros tenham capacidade para excluir BSA, o IIP-HEMA- $\text{BSA}_{(\text{ACN})}$  foi o único polímero que apresentou potencial para pré-concentrar íons  $\text{Cu}^{2+}$  e excluir simultaneamente BSA, uma vez que os maiores sinais de absorvância foram obtidos com este polímero na ausência e presença de BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) em pH 4,75. Desta forma, um intervalo de pH mais estreito (4,00-5,00) foi avaliado para que o sinal de Cu na ausência e presença de BSA seja o mais próximo possível.

Na Figura 44 pode-se observar que os sinais de absorvância de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) em pH 4,50 estão mais próximos do que em pH 4,75.

**Figura 44.** Sinal de absorvância do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) em pH 4,00, 4,50, 4,75 e 5,00 sem tampão utilizando IIP-HEMA- $\text{BSA}_{(\text{ACN})}$  em sistema de pré-concentração FIA.



Condições: massa de polímero: 50,0 mg; concentração de 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ; volume de pré-concentração: 20,0 mL; vazão de pré-concentração/eluição: 5,0  $\text{mL min}^{-1}$ ; eluente: 1,00  $\text{mol L}^{-1}$  HCl.

A diferença entre os sinais de absorvância, mostrados na Figura 44, é devido a que a proteína BSA em pH menores ao  $pH_{PIE}$  sofre mudanças na sua conformação estrutural (N→F), adquirindo assim maior intensidade de carga positiva e menor interação com íons  $Cu^{2+}$  por efeitos de repulsão e, conseqüentemente, o íon  $Cu^{2+}$  consegue ter maior interação com a matriz polimérica. Portanto, o pH 4,50 na ausência de tampão foi selecionado como o valor ideal para pré-concentrar o íon  $Cu^{2+}$  e excluir BSA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) nos outros estudos.

## 5.5 ESTUDO DE SELETIVIDADE

Neste estudo foi observado que o IIP-HEMA- $BSA_{(ACN)}$  não apresentou seletividade para o íon  $Cu^{2+}$  quando comparado com o NIP-HEMA- $BSA_{(ACN)}$  (dados não apresentados), uma vez que os valores de  $k'$  foram menores que 1,0 para  $Cu^{2+}/Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}/Pb^{2+}$  e  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ . Esses resultados podem ser devido à interação não seletiva da BSA (camada externa) com os cátions competidores mediante os grupos -COOH e N-terminal ( $\alpha-NH_2$ ) [143,144,216]. Desta forma, o estudo de seletividade foi realizado com os polímeros IIP $_{(ACN)}$  e IIP-HEMA $_{(ACN)}$  com seus respectivos polímeros controle NIP $_{(ACN)}$  e NIP-HEMA $_{(ACN)}$ . Os coeficientes de distribuição ( $K_d$ ), os coeficientes de seletividade ( $k$ ) e os coeficientes de seletividade relativo ( $k'$ ) obtidos a partir das soluções binárias de  $Cu^{2+}/Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}/Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}/Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}/Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}/Pb^{2+}$  e  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$  com concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  do analito e do cátion competitivo são apresentados na Tabela 4.

O valor do coeficiente  $k'$  acima de 1,0 de cada mistura binária mostra que o IIP $_{(ACN)}$  apresenta maior seletividade para os íons  $Cu^{2+}$  quando comparado com o IIP-HEMA $_{(ACN)}$  mesmo na presença de outros cátions competitivos. Este fato pode ser atribuído à menor quantidade de sítios de ligação seletivos presentes no IIP-HEMA $_{(ACN)}$ , uma vez que o íon  $Cu^{2+}$  pode interagir com o co-monômero HEMA durante a síntese [66]. O coeficiente  $k'$  para IIP $_{(ACN)}$  é maior em relação ao NIP $_{(ACN)}$  na presença de  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , e menor na presença  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ . Este comportamento é devido à formação de complexos estáveis entre o grupo funcional C=S (Base mole) e os cátions  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  (Ácidos moles), quando comparado com a interação entre a base mole e os ácidos intermediários ou duros ( $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ) segundo a classificação de Pearson em ácido-base duros e moles dos íons metálicos e ligantes (Figura 2) [100].

**Tabela 4.** Valores do coeficiente de distribuição ( $K_d$ ), coeficiente de seletividade ( $k$ ) e coeficiente de seletividade relativo ( $k'$ ) dos polímeros impressos [IIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] e os polímeros controle não-impressos [NIP<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] para o íon Cu<sup>2+</sup> e os cátions competitivos (M<sup>2+</sup>) em concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

Mistura Binária	Polímeros	$K_d$		$k$	$k'$
		Cu <sup>2+</sup>	M <sup>2+</sup>		
Cu <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	18,5	1,5	12,35	1,9
	NIP <sub>(ACN)</sub>	33,7	5,3	6,36	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1471,4	628,5	2,34	0,9
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1215,1	469,9	2,59	
Cu <sup>2+</sup> /Co <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	20,7	7,1	2,91	3,7
	NIP <sub>(ACN)</sub>	37,3	47,8	0,78	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	258,7	429,0	0,60	1,2
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	384,3	733,0	0,52	
Cu <sup>2+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	29,2	347,5	0,08	2,8
	NIP <sub>(ACN)</sub>	47,7	1613,0	0,03	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1237,4	2071,2	0,60	2,1
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1964,8	6856,5	0,29	
Cu <sup>2+</sup> /Ni <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	17,4	8,8	1,98	4,7
	NIP <sub>(ACN)</sub>	21,8	51,4	0,42	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	454,2	206,7	2,20	0,6
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	948,5	243,8	3,89	
Cu <sup>2+</sup> /Pb <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	21,7	13,4	1,62	1,0
	NIP <sub>(ACN)</sub>	37,1	22,1	1,68	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	258,7	429,0	0,60	1,2
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	384,3	733,0	0,52	
Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	12,9	7,6	1,70	7,1
	NIP <sub>(ACN)</sub>	21,4	90,0	0,24	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	719,1	65,6	10,97	2,8
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1283,9	331,6	3,87	

Embora o íon Cu<sup>2+</sup> seja da mesma classificação que os íons Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, a seletividade do polímero IIP<sub>(ACN)</sub> pelos íons Cu<sup>2+</sup> é determinada pela geometria de coordenação e tamanho da cavidade impressa formada durante a síntese, uma vez que, os íons Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> têm maior tamanho do que o íon Cu<sup>2+</sup> (71,0 pm), com valores de raio iônico hidratado de 88,5, 92,0, 83,0 e 88,0 pm respectivamente.

É importante salientar que o enxofre, como átomo doador de elétrons, encontra-se na mesma proporção nos polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> segundo os resultados da análise elementar CHNS. Este fato permite

constatar que o IIP<sub>(ACN)</sub> apresenta impressão química e que a presença do Cu na síntese proporciona a organização do monômero ATU em torno de si mesmo, formando o complexo e, após a sua remoção, as cavidades seletivas.

Apesar do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> não apresentar seletividade para Cu na presença de outros íons potencialmente competitivos, é o único polímero capaz de adsorver maiores quantidades de íons Cu<sup>2+</sup>, em comparação com os polímeros IIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> e NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> (Figura 35), e excluir simultaneamente proteína na ausência de tampão (Figura 40). Por conseguinte, o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> foi escolhido para desenvolver o método analítico baseado na pré-concentração de íons Cu<sup>2+</sup> com exclusão de proteína e posterior aplicação em amostras de leite.

Cabe salientar que o IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> também poderia ser utilizado para pré-concentrar íons Cu<sup>2+</sup> e excluir simultaneamente proteína em pH ~ 6,75 sem tampão (Figura 40), pois, além de apresentar maior seletividade que o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, nessas condições não seria necessário ajustar o valor de pH das amostras (Quadro 8). No entanto, se a pré-concentração dos íons Cu<sup>2+</sup> fosse realizada em pH ~ 6,75 sem tampão, a proteína do leite causaria pressão e entupimento da minicoluna, inviabilizando a análise mesmo após diluições da amostra, como será apresentado no estudo da aplicação do método em amostras de leite (seção 5.10). Dessa forma, o polímero IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> não foi escolhido como fase adsorvente para o desenvolvimento do método analítico.

## 5.6 OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Cu<sup>2+</sup> EM SISTEMA FIA-F AAS POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA

Para a otimização da pré-concentração de íons Cu<sup>2+</sup> empregando o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em sistema FIA-F AAS foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com ponto central em triplicata com objetivo de avaliar o efeito das variáveis: massa de polímero (MP), vazão de pré-concentração (VP) e concentração do eluente (CE), fixando o valor de pH em 4,50 na ausência de solução tampão. A Tabela 5 mostra os níveis descodificados (inferior, ponto central e superior) para as variáveis independentes (fatores) utilizando como variável dependente (resposta), a absorbância (Abs, altura de pico) e a eficiência de sensibilidade (ES). Os tempos de pré-concentração foram de 343, 218 e 157 s para a vazão dos níveis inferior, ponto central e superior, respectivamente.

Na Tabela 5, os sinais de absorvância nos diferentes níveis (inferior, superior e ponto central) são similares, entretanto, com a eficiência de sensibilidade observou-se uma diferença na resposta ao mudar do nível inferior para o nível superior, devido ao tempo requerido na etapa de pré-concentração.

**Tabela 5.** Fatores, níveis descodificados e respostas analíticas (absorvância e eficiência de sensibilidade) obtidas pela matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central em triplicata.

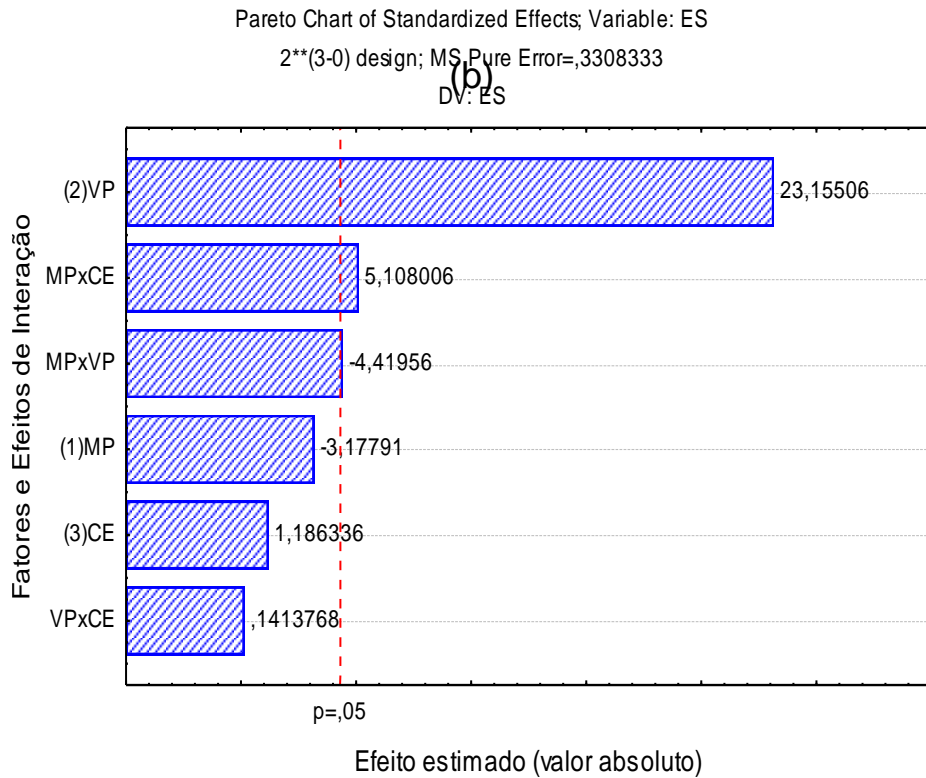
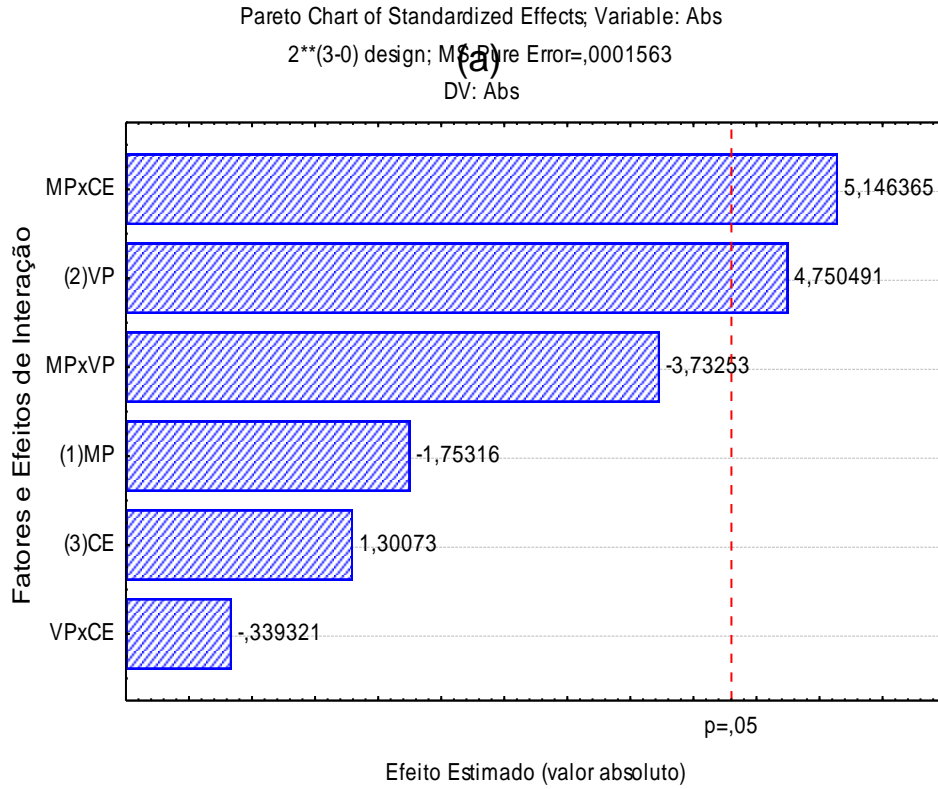
Fatores		Níveis			Abs*	ES** ( $\times 10^{-4}$ )
		Inferior (-1)	Ponto central (0)	Superior (1)		
(1) Massa do Polímero - MP (mg)		50,0	75,0	100,0		
(2) Vazão de Pré-concentração - VP ( $\text{mL min}^{-1}$ )		3,4	5,5	7,6		
(3) Concentração do Eluente HCl - CE ( $\text{mol L}^{-1}$ )		1,00	1,50	2,00		
Ensaio	MP	VP	CE	Abs*	ES** ( $\times 10^{-4}$ )	
1	-1	-1	-1	0,203	5,92	
2	1	-1	-1	0,173	5,04	
3	-1	1	-1	0,279	17,77	
4	1	1	-1	0,187	11,91	
5	-1	-1	1	0,170	4,96	
6	1	-1	1	0,235	6,85	
7	-1	1	1	0,244	15,54	
8	1	1	1	0,239	15,22	
9	0	0	0	0,208	9,54	
10	0	0	0	0,183	8,39	
11	0	0	0	0,196	8,99	

\* Absorvância (altura do pico)

\*\* Eficiência de sensibilidade [absorvância/tempo (s) requerido na etapa de pré-concentração]

Os efeitos principais e de interação foram avaliados separadamente para cada resposta por análise de variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 95,0%, e as variáveis significativas representadas graficamente na forma diagrama de Pareto (Figura 45). A significância estatística de cada fator foi observada quando a barra de efeito ultrapassa a linha vertical dos 95,0% de confiança [171]. De acordo com os resultados da ANOVA, o  $F_{\text{Calculado}}$  ( $\text{MQ}_{\text{Falta de ajuste}}/\text{MQ}_{\text{Erro puro}}$ ) utilizando como resposta a absorvância (2,98) e eficiência de sensibilidade (8,17) foram menores que o  $F_{\text{Tabelado}}$  (19,00), indicando que o modelo estatístico não apresenta evidência de falta de ajuste, com valor de  $R^2$  de 0,973 e 0,992, respectivamente.

**Figura 45.** Diagrama de Pareto dos efeitos principais [(1) MP= Massa do Polímero, (2) VP= Vazão de Pré-concentração, (3) CE=concentração do HCl como eluente], e suas interações (MPxVP, MPxCE, VPxCE) quando analisados (a) pela absorvância – altura do pico e (b) pela eficiência de sensibilidade.



Com base no diagrama de Pareto e analisado pelo sinal de absorvância (Figura 45a), observa-se que a interação MPxCE e o fator vazão de pré-concentração (VP) são relevantes no sinal de absorvância e estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), com efeito positivo estimado de 5,15 vezes (MPxCE) e 4,75 vezes (VP). A massa do polímero (MP) e a concentração do eluente (CE) na forma individual não foram relevantes na pré-concentração do Cu dentro do domínio experimental.

Por outro lado, quando o Pareto é analisado pela ES (Figura 45b), a vazão de pré-concentração (VP) se torna mais significativa, apresentando efeito positivo de 4,53 vezes maior em relação à interação MPxCE. Este comportamento é atribuído à diferença de tempo requerido na etapa de pré-concentração nos diferentes níveis. Assim, a VP em seu nível superior ( $7,6 \text{ mL min}^{-1}$ ) necessita de menor tempo na etapa de pré-concentração e, conseqüentemente, obtém-se uma maior frequência analítica. No planejamento experimental, maiores valores de VP não foram testados para evitar vazamentos na minicoluna devido à sobrepressão resultante.

As Eq. 16 e 17 representam a relação entre a absorvância e a eficiência de sensibilidade com os fatores estudados, respectivamente.

$$\text{Abs} = 0,211_{(\pm 0.015)} - 0,008\text{MP}_{(\pm 0.006)} + \mathbf{0,021\text{VP}}_{(\pm 0.004)} + 0,006\text{CE}_{(\pm 0.012)} - 0,017(\text{MPxVP})_{(\pm 0.032)} + \mathbf{0,023(\text{MPxCE})}_{(\pm 0.005)} - 0,002(\text{VPxCE})_{(\pm 0.0128)} \quad \text{Eq. (16)}$$

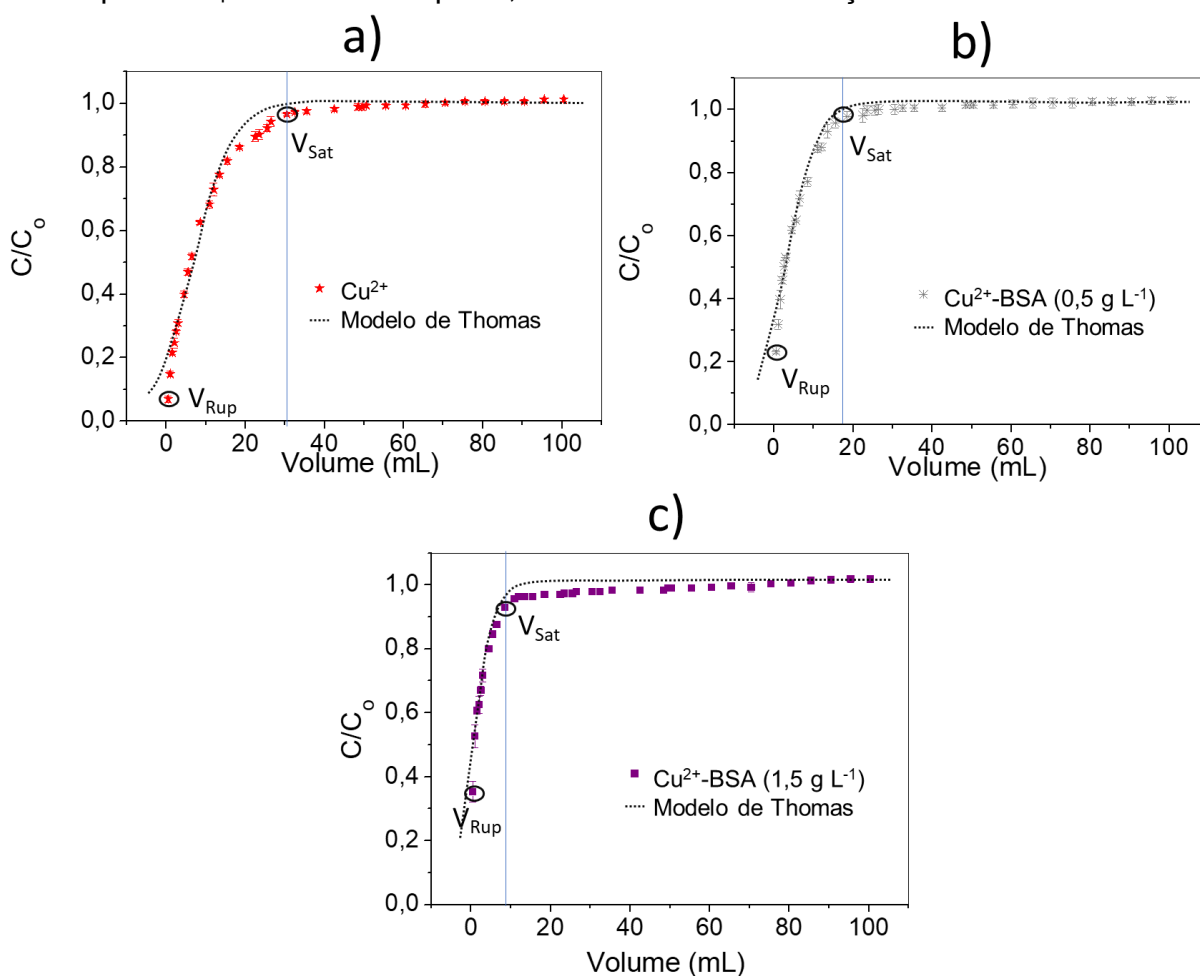
$$\text{ES} = 10,012_{(\pm 0.746)} - 0,646\text{MP}_{(\pm 0.875)} + \mathbf{4,709\text{VP}}_{(\pm 0.875)} + 0,241\text{CE}_{(\pm 0.392)} - 0,899(\text{MPxVP})_{(\pm 0.875)} + \mathbf{1,039(\text{MPxCE})}_{(\pm 0.875)} + 0,029(\text{VPxCE})_{(\pm 0.875)} \quad \text{Eq. (17)}$$

Considerando que os fatores MP e CE não foram significativos ( $p > 0,05$ ) nas duas respostas analíticas, conforme visto nas Eq. 16 e 17, optou-se por trabalhar com esses fatores em níveis inferiores (-1). Desta forma,  $50,0 \text{ mg}$ ,  $7,6 \text{ mL min}^{-1}$  e  $1,00 \text{ mol L}^{-1}$  foram escolhidos dentro do domínio experimental, como os melhores níveis para os fatores MP, VP e CE, respectivamente, para realizar os próximos experimentos.

### 5.7 CURVA DE RUPTURA

A quantidade em massa ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de íons  $\text{Cu}^{2+}$  adsorvida pelo polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, em função do tempo, é descrita por meio de curvas de ruptura. Estas curvas foram avaliadas de acordo com o efeito da concentração da proteína BSA ( $0,5$  e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ) sobre a adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em condições dinâmicas. Assim, o modelo não linear de Thomas foi aplicado a cada curva de ruptura para comparar a quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  adsorvida pelo polímero no ponto de saturação ( $q_{\text{sat}}$ ), calculada experimentalmente, com a quantidade prevista pelo modelo ( $q_{\text{Th}}$ ) na ausência e presença de BSA. O modelo não linear de Thomas e as curvas de ruptura são apresentadas na Figura 46.

**Figura 46.** Modelo não linear de Thomas aplicado às curvas de rupturas obtidas pela percolação de soluções contendo: A)  $\text{Cu}^{2+}$ , B)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e C)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ), através da minicoluna contendo  $50,0 \text{ mg}$  do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> com vazão constante de  $7,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições:  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , pH  $4,50$  na ausência de tampão.  $V_{\text{Rup}}$ : volume de ruptura,  $V_{\text{Sat}}$ : volume de saturação.



Como observado na Figura 46, o formato das curvas de ruptura obtidas na ausência e presença de BSA (0,5 e 1,5 g L<sup>-1</sup>) é semelhante. A quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> adsorvido ( $q_{Rup}$ , mg g<sup>-1</sup>) no volume de ruptura ( $V_{Rup} = 0,5$  mL) foi 0,009, 0,008 e 0,007 mg g<sup>-1</sup>, quando percoladas as soluções de Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>-BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e Cu<sup>2+</sup>-BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>), respectivamente. Desta forma, pode-se observar que a quantidade de Cu<sup>2+</sup> adsorvida no polímero decresce com a presença da proteína BSA devido à forte interação entre os íons Cu<sup>2+</sup> e a proteína em solução, obtendo-se menor transferência de massa na superfície do polímero no  $V_{Rup}$  quando percolada a solução de íons Cu<sup>2+</sup> na presença de 1,5 g L<sup>-1</sup> de BSA.

Ao decorrer do tempo de percolação, a superfície do polímero começa a saturar-se ( $q_{Sat}$ ), o qual é refletido na inflexão da curva de ruptura. Esta inflexão é mais acentuada na presença da proteína BSA, especificamente, na concentração de 1,5 g L<sup>-1</sup> (Figura 46c). Consequentemente, quanto mais acentuada a inflexão da curva, menor será o volume para alcançar o ponto de saturação ( $V_{Sat}$ , mL), bem como a quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> adsorvido no polímero ( $q_{Sat}$ , mg g<sup>-1</sup>). Desta forma, menores valores de  $V_{Sat}$  (9,2 mL) e de  $q_{Sat}$  (0,038 mg g<sup>-1</sup>) foram obtidas com a solução Cu<sup>2+</sup>-BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>), enquanto que, com as soluções de íons Cu<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>-BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) foram obtidos valores de 30,5 e 13,9 mL para  $V_{Sat}$  e de 0,086 e 0,053 mg g<sup>-1</sup> para  $q_{Sat}$ , respectivamente. A diferença entre os valores de  $q_{Sat}$  nas três condições é atribuída à concentração da BSA, pois com o aumento da concentração (1,5 g L<sup>-1</sup>), há maior probabilidade de a proteína ficar retida na superfície do polímero, obstruindo e saturando os poros do polímero e dificultando a interação com os íons Cu<sup>2+</sup>.

A partir da aplicação do modelo não linear de Thomas, foi determinada a quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> adsorvida no polímero ( $q_{Th}$ ) e a constante de Thomas ( $k_{Th}$ ). Os valores de  $q_{Th}$  e  $k_{Th}$ , obtidos para as três curvas de ruptura, são apresentados na Tabela 6 junto com outros parâmetros que foram mencionados anteriormente.

**Tabela 6.** Parâmetros obtidos a partir das curvas de ruptura e do modelo de Thomas na sorção de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) utilizando o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> em condições dinâmicas.

Curva de ruptura	$C_0$ (mg mL <sup>-1</sup> , $\times 10^{-3}$ )	Q (mL min <sup>-1</sup> ),	$V_{\text{Rup}}$ (mL)	$V_{\text{Sat}}$ (mL)	$q_{\text{Rup}}$ (mL)	$q_{\text{Sat}}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$q_{\text{Th}}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$k_{\text{Th}}$ (mL min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	$R^2$	SQE	REQM
<b><math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	1,009	7,6	0,5	30,5	0,009	0,086	0,146	1012	0,984	0,052	0,039
<b><math>\text{Cu}^{2+}</math>-BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>)</b>	1,032	7,6	0,5	13,9	0,008	0,053	0,069	1187	0,984	0,030	0,030
<b><math>\text{Cu}^{2+}</math>-BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>)</b>	1,016	7,6	0,5	9,2	0,007	0,038	0,019	1801	0,982	0,043	0,035

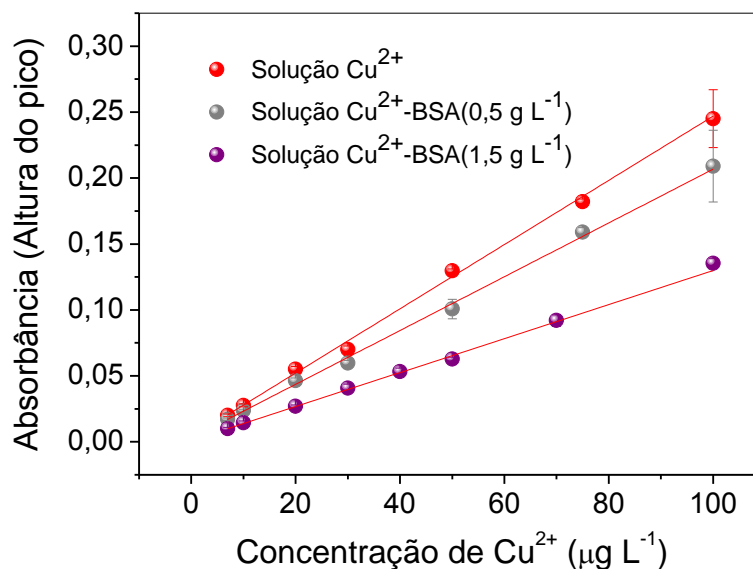
$C_0$ : concentração inicial do  $\text{Cu}^{2+}$ ; Q: vazão de alimentação;  $V_{\text{Rup}}$ : volume de ruptura, quando  $C = 5,0\%$  de  $C_0$ ;  $V_{\text{Sat}}$ : volume de saturação, quando  $C \geq 95,0\%$  de  $C_0$ ;  $q_{\text{Rup}}$ : quantidade adsorvida no  $V_{\text{Rup}}$ ;  $q_{\text{Sat}}$ : quantidade adsorvida no  $V_{\text{Sat}}$ ;  $q_{\text{Th}}$ : quantidade adsorvida calculada a partir do modelo de Thomas;  $k_{\text{Th}}$ : constante do modelo de Thomas; SQE: soma quadrada dos erros; REQM: raiz do erro quadrático médio.

Na Tabela 6 pode-se observar que a medida que aumenta a concentração da proteína BSA maior é a constante de Thomas ( $k_{Th}$ ), ou seja, menor é a transferência de íons  $Cu^{2+}$  da solução (fase líquida) para a superfície do polímero (fase sólida). Por outro lado, observa-se que os valores de  $q_{Sat}$  determinados experimentalmente para  $Cu^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $Cu^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) são similares com os valores de  $q_{Th}$  (preditos pelo modelo não linear de Thomas), ou seja, os dados obtidos experimentalmente e utilizados para a construção das respectivas curvas de ruptura, se ajustam satisfatoriamente ao modelo não linear de Thomas. O ajuste pode ser verificado a partir dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), em que todos foram próximos de 0,99 (Tabela 6).

#### 5.8 PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO PROPOSTO.

Considerando que a concentração de 0,5 e 1,5 g L<sup>-1</sup> de BSA interferiram no processo de adsorção dos íons  $Cu^{2+}$ , como foi observado no estudo de capacidade máxima de adsorção em condições dinâmicas (curva de ruptura), optou-se por determinar os parâmetros analíticos com e sem a etapa de pré-concentração de íons  $Cu^{2+}$  em três condições diferentes: (●) íons  $Cu^{2+}$  na ausência de BSA, (●)  $Cu^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e (●)  $Cu^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>). Assim, sob condições otimizadas, a pré-concentração de  $Cu^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $Cu^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) na faixa de concentração de 7,0 – 100,0 µg L<sup>-1</sup> de íons  $Cu^{2+}$  em pH 4,50 na ausência de tampão em sistema FIA-F AAS, forneceu três curvas analíticas (Figura 47). As equações lineares obtidas foram: íons  $Cu^{2+}$  (●)  $Abs = 0,0024 \pm 0,0001 (Abs. L \mu g^{-1}) [Cu^{2+}, (\mu g L^{-1})] + 0,0036 (r = 0,999)$ ;  $Cu^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) (●)  $Abs = 0,0021 \pm 0,0002 (Abs. L \mu g^{-1}) [Cu^{2+}, (\mu g L^{-1})] + 0,0018 (r = 0,999)$ ; e  $Cu^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) (●)  $Abs = 0,0013 \pm 0,00004 (Abs. L \mu g^{-1}) [Cu^{2+}, (\mu g L^{-1})] + 6,0 \times 10^{-5} (r = 0,999)$ .

**Figura 47.** Curvas analíticas obtidas com a pré-concentração de (●) íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência de BSA, (●)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) e (●)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ), em sistema FIA-F AAS sob condições otimizadas (50,0 mg do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, vazão de pré-concentração de 7,6 mL  $\text{min}^{-1}$ , pH: 4,50 sem tampão e eluente HCl 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$ ).



Os coeficientes angulares (●)  $0,0024 \pm 0,0001$  e (●)  $0,0021 \pm 0,0002$  (Abs.  $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$ ) das curvas analíticas (Figura 47) obtidas com a etapa de pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ), respectivamente, não diferem estatisticamente entre si segundo o teste t-Student em um intervalo de 95,0% de confiança, o que permite afirmar que com o método proposto é possível obter similares sinais de absorbância de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença de 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  de BSA.

Cabe salientar que a proteína BSA na concentração 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  mostrou interferência no estudo de capacidade máxima de adsorção (curva de ruptura), porém, não interferiu na inclinação da curva analítica (●), em relação à pré-concentração dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  (●), devido as condições, tais como concentração de Cu, volume de solução percolada e tempo de contato, são diferentes nos dois estudos.

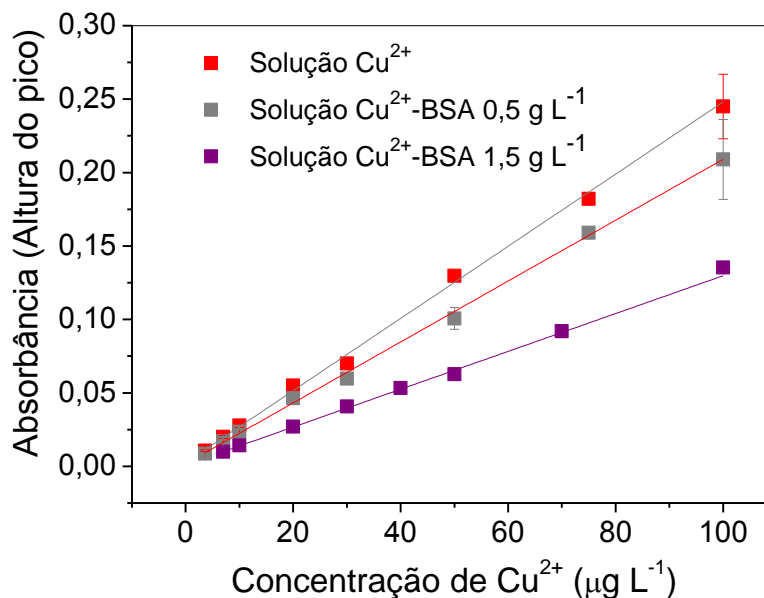
No entanto, com o aumento da concentração da proteína BSA (1,5 g  $\text{L}^{-1}$ ), o sinal de absorbância de íons  $\text{Cu}^{2+}$  diminui aproximadamente 50,0% na faixa de 50,0 - 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  (●). Isto se deve ao fato de a proteína estar retida na superfície do polímero como consequência do aumento de sua concentração, saturando os poros do polímero e dificultando a transferência de massa dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  para a superfície do material, como observado no estudo de curva de ruptura.

O LD e LQ do método proposto foram calculados para cada condição [ $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g  $\text{L}^{-1}$ )], a partir do desvio padrão (DP) do sinal de

absorbância (n=10) do branco analítico e dos coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com a etapa de pré-concentração.

Com intuito de verificar o efeito do LQ teórico na linearidade da curva analítica, soluções de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de cada LQ, calculados para  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>), foram preparadas no laboratório e submetidas ao sistema FIA-F AAS. Com o sinal de absorbância obtido, o valor do LQ foi inserido na respectiva curva analítica como o primeiro ponto da curva, obtendo novas curvas analíticas, as quais são apresentadas na Figura 48. As equações lineares obtidas foram: íons  $\text{Cu}^{2+}$  (■) Abs = 0,0024±0,0001 (Abs. L µg<sup>-1</sup>) [ $\text{Cu}^{2+}$ , (µg L<sup>-1</sup>)] + 0,0032 (r = 0,999);  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) (■) Abs = 0,0021±0,0002 (Abs. L µg<sup>-1</sup>) [ $\text{Cu}^{2+}$ , (µg L<sup>-1</sup>)] + 0,0014 (r = 0,999); e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) (■) Abs = 0,0013±0,00004 (Abs. L µg<sup>-1</sup>) [ $\text{Cu}^{2+}$ , (µg L<sup>-1</sup>)] + 2,0x10<sup>-5</sup> (r = 0,999).

**Figura 48.** Curvas analíticas obtidas com a inserção do LQ teórico e a etapa de pré-concentração de: (■) íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência de BSA, (■)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e (■)  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 g L<sup>-1</sup>) em sistema FIA-F AAS sob condições otimizadas (50,0 mg do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, vazão de pré-concentração de 7,6 mL min<sup>-1</sup>, pH 4,50 sem tampão e eluente HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup>). LQ: limite de quantificação. Faixa de concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ : LQ-100 µg L<sup>-1</sup>.

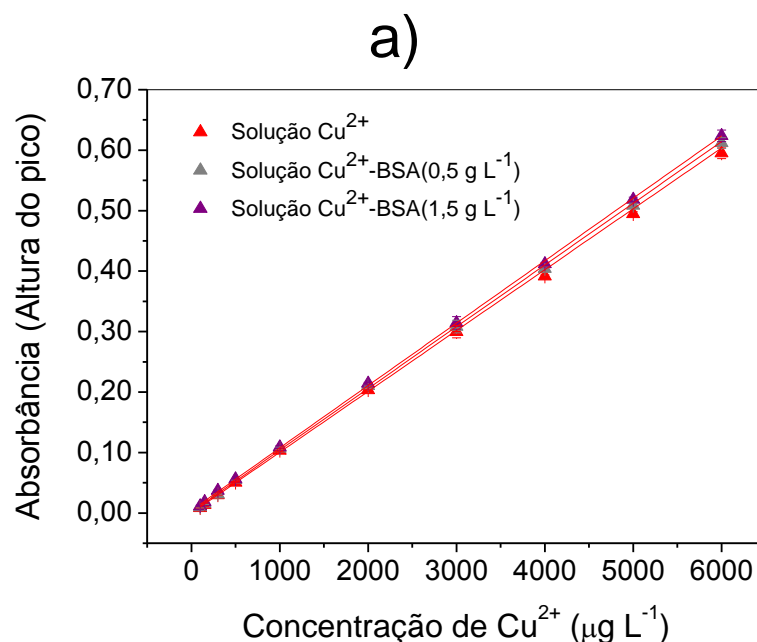


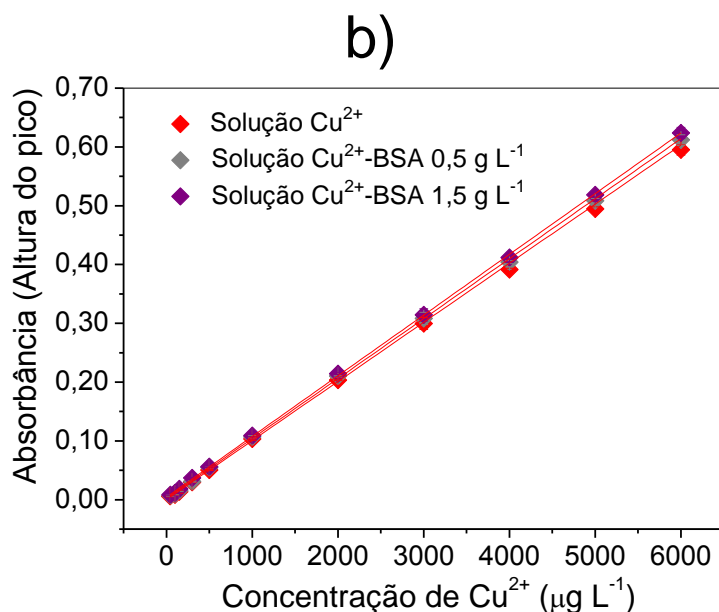
Como exposto, os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com a etapa de pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência de BSA [(●) 0,0024±0,0001 e (■) 0,0024±0,0001 (Abs. L µg<sup>-1</sup>)] e apresentadas nas Figuras 47 e 48, respectivamente, são iguais, o qual permite afirmar que a inserção do LQ teórico na curva analítica não interferiu na linearidade, e que os valores obtidos são de fato mensuráveis com

exatidão. Esse mesmo comportamento foi observado para os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com a pré-concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ).

Por outro lado, na Figura 49a são apresentadas três curvas analíticas que foram construídas sem a etapa de pré-concentração de ( $\blacktriangle$ )  $\text{Cu}^{2+}$ , ( $\blacktriangle$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e ( $\blacktriangle$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ), na faixa de concentração de  $100,0 - 6000,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . As equações lineares das curvas analíticas construídas sem a etapa de pré-concentração foram: ( $\blacktriangle$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0010$  com  $r = 0,999$  para  $\text{Cu}^{2+}$ ; ( $\blacktriangle$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0025$  com  $r = 0,999$  para  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ); e ( $\blacktriangle$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0045$  com  $r = 0,999$  para  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Ao inserir o LQ teórico, as novas curvas analíticas (Figura 48b) apresentaram similares equações lineares: íons  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\blacklozenge$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0012$  com  $r = 0,999$ ;  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) ( $\blacklozenge$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0025$  com  $r = 0,999$ ; e  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ) ( $\blacklozenge$ )  $\text{Abs} = 0,0001 \pm 0,00001 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0044$  com  $r = 0,999$ .

**Figura 49.** Curvas analíticas obtidas sem a etapa de pré-concentração (aspiração direta no F AAS) de: a) ( $\blacktriangle$ ) íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência de BSA, ( $\blacktriangle$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e ( $\blacktriangle$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) na faixa de concentração de  $100,0 - 6000,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ; b) Inserção do LQ (Limite de Quantificação) nas curvas: ( $\blacklozenge$ ) íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência de BSA, ( $\blacklozenge$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e ( $\blacklozenge$ )  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ).





Com base no perfil das curvas analíticas construídas sem a etapa de pré-concentração (Figura 49) é possível constatar que a presença do BSA não interfere na atomização do Cu, uma vez que as três curvas analíticas têm o mesmo coeficiente angular.

É importante salientar que os pontos de cada curva analítica correspondem à média de  $n=3$  com seus respectivos DP (Desvio Padrão). Para avaliar a qualidade do ajuste dos dados experimentais, utilizados na construção das curvas analíticas, ao modelo de regressão linear foi realizada a ANOVA (*Analysis of Variance*), em que, não houve evidência de falta de ajuste para os valores observados em relação aos valores previstos pelo modelo nas condições e faixas de concentração escolhidas, uma vez que o  $F_{\text{Calculado}}$  ( $MQ_{\text{Falta de ajuste}}/MQ_{\text{Erro puro}}$ ) foi menor que o  $F_{\text{Tabelado}}$  ( $F_{\text{Calculado}} < F_{\text{Tabelado}}$ ) para: curvas analíticas com pré-concentração (●)  $0,28 < 2,96$ , (●)  $0,63 < 2,96$  e (●)  $1,70 < 2,74$ ; curvas analíticas com pré-concentração e inserção do LQ (■)  $0,67 < 2,74$ , (■)  $0,27 < 2,74$  e (■)  $1,63 < 2,58$ ; curvas analíticas sem etapa de pré-concentração (▲)  $1,29 < 2,45$ , (▲)  $1,29 < 2,45$  e (▲)  $0,87 < 2,45$ ; e curvas analíticas sem etapa de pré-concentração com inserção do LQ (◆)  $1,26 < 2,34$ , (◆)  $1,26 < 2,34$  e (◆)  $0,85 < 2,34$ .

Por outro lado, os demais parâmetros analíticos como limite de detecção (LD), fator de pré-concentração (FPC), eficiência de pré-concentração (EP), índice de consumo (IC) e frequência analítica (FA) foram calculados e apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros analíticos para íons  $\text{Cu}^{2+}$  com e sem etapa de pré-concentração, na presença e ausência de 0,5 e 1,5  $\text{g L}^{-1}$  de BSA, com adição do LQ.

Curva analítica	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação linear	r	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	FPC	EP ( $\text{min}^{-1}$ )	IC (mL)	FA ( $\text{h}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}$	3,6 – 100,0	Abs = 0,0024x + 0,0032	0,999	1,1	3,6	24	9,1	0,83	20
$\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 $\text{g L}^{-1}$ )	4,1 – 100,0	Abs = 0,0021x + 0,0014	0,999	1,2	4,1	21	8,0	0,95	20
$\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 $\text{g L}^{-1}$ )	6,6 – 100,0	Abs = 0,0013x + 2,0x10 <sup>-5</sup>	0,999	2,0	6,6	13	5,0	1,54	20
$\text{Cu}^{2+}$ (*)	44,0 – 6000	Abs = 0,0001x + 0,0012	0,999	13,2	44,0	-	-	-	-
$\text{Cu}^{2+}$ -BSA(0,5 $\text{g L}^{-1}$ ) (*)	44,8 – 6000	Abs = 0,0001x + 0,0025	0,999	13,4	44,8	-	-	-	-
$\text{Cu}^{2+}$ -BSA(1,5 $\text{g L}^{-1}$ ) (*)	45,0 – 6000	Abs = 0,0001x + 0,0044	0,999	13,5	45,0	-	-	-	-

(\*) Sem etapa de pré-concentração; x = [ $\text{Cu}^{2+}$ , ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )]; r = Coeficiente de Correlação; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; FPC: Fator de Pré-concentração; EP: Eficiência de Pré-concentração; IC: Índice de Consumo; FA: Frequência Analítica. Condições da pré-concentração: Massa do polímero: 50,0 mg; Volume de pré-concentração: 20,0 mL; pH: 4,50 na ausência de tampão; Vazão de pré-concentração: 7,6  $\text{mL min}^{-1}$ ; Eluente: HCl 1,00  $\text{mol L}^{-1}$ .

Os parâmetros analíticos LD, LQ, FPC, EP obtidos neste estudo, além do volume de pré-concentração (VP), foram comparados com os parâmetros analíticos obtidos em outros métodos analíticos reportados na literatura (Quadro 9), que também usaram a extração em fase sólida (SPE) para pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com determinação pela técnica F AAS

Como observado no Quadro 9, o método proposto forneceu um fator de pré-concentração maior usando menor volume de amostra, quando comparado com os outros métodos, com exceção do trabalho relatado por Elci e colaboradores [219]. O LD e LQ obtidos neste estudo foram considerados satisfatórios, pois os outros métodos utilizaram SPE em sistema off-line ou em batelada com maior tempo de pré-concentração, maior massa de adsorvente ou maior volume de amostra, o que favorece a interação entre o adsorvente e o íon metálico. Além disso, vale destacar que a maior vantagem do método proposto é sua aplicação em amostras de leite bovino e leite de soja, empregando mínimas etapas de pré-tratamento das amostras. Em contrapartida, a maioria dos métodos reportados foram aplicados em amostras de água ou em amostras previamente digeridas com ácidos minerais concentrados, os quais têm um custo de aquisição relativamente alto, o qual pode ser considerado inviável desde uma perspectiva econômica, bem como seu desencontro ao predito para uma química verde.

A reutilização do polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> não foi avaliada. No entanto, deve-se ressaltar que apenas uma minicoluna foi utilizada para realizar todos os experimentos desta Tese, incluindo estudo de pH, otimização do método empregando análise multivariada, curva de ruptura, construção das curvas analíticas, estudo de interferentes e aplicação do método em amostras reais. Foram realizados mais de 450 ciclos de pré-concentração/eluição sem diminuição da capacidade de adsorção. Este resultado é superior à maioria dos adsorventes publicados para pré-concentração de Cu, atestando assim a alta estabilidade do IIP-HEMA-BSA [220-222].

**Quadro 9.** Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no método proposto com outros métodos analíticos usando SPE para pré-concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com determinação pela técnica F AAS.

Adsorvente	Modalidade de Pré-concentração	Modo de Detecção	Parâmetros Analíticos				Amostras	Ref.
			LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PF	PV (mL)		
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA	MdSPE Sistema batelada	F AAS	0,22	0,75	150,0	450,0	Alimentos orgânicos para bebês, cereais, macarrão, mel e leite.	11
Polianilina	SPE <i>On-line</i>	MIS-F AAS	1,98	6,28	50,0	10,0	Água potável, água mineral engarrafada, água residual e água do mar.	219
Resina de Amberlite XAD-8	SPE <i>Off-line</i>	F AAS	0,20	NI	10,0	50,0	Água natural, arroz, chá preto e tabaco.	223
Óxido de grafeno (GO)	SPE <i>Off-line</i>	F AAS	0,28	NI	312,5	1250	Água, queijo, mel, tomate, folhas de espinafre e leite.	224
D2EHPA – MWCNT	SPE <i>Off-line</i>	F AAS	50,00	NI	25,0	100,0	Águas naturais, águas residuais de industriais de galvanização.	225
Surfactante catiônico e pareamento iônico	LL-ISS-SPE <i>Off-line</i>	F AAS	0,10	NI	38,7	40,0	Amostras de água (água de rio, águas residuais e água mineral)	226
Nanocompósitos $\text{MnO}_2/3\text{MgO}$	SPE Sistema batelada	F AAS	4,00	12,10	20,0	50,0	Água de torneira, água de entrada/saída de refinaria, cogumelo e arroz.	227
Carvão ativado de tecido	PPT-SPE Sistema batelada	F AAS	2,00	-	120,0	600,0	Água de torneira, água residual, água de mar, água de barragem e amostras de fertilizantes.	228
IIP-HEMA-BSA	SPE <i>On-line</i>	FI-F AAS	1,10	3,60	24,0	20,0	Leite bovino e soja.	Este trabalho

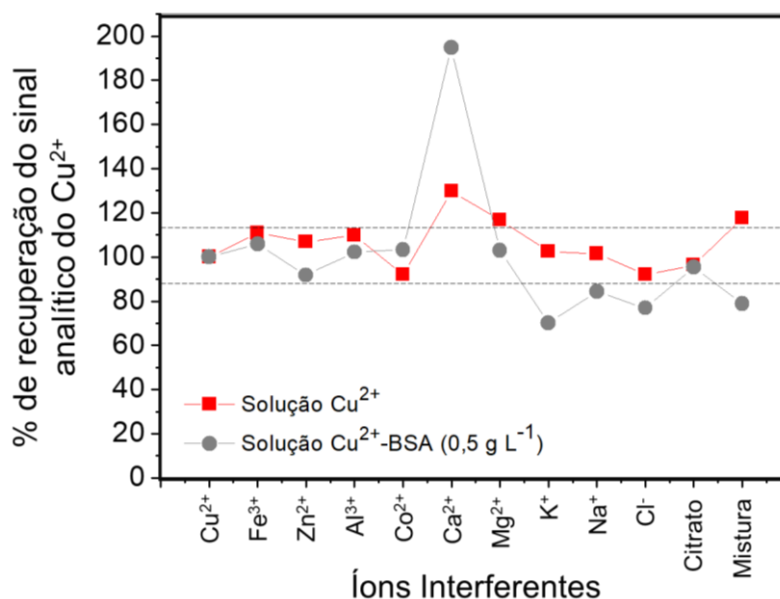
LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; FPC: Fator de Pré-concentração; EP: Eficiência de Pré-concentração; VP: Volume de Pré-concentração (mL); NI: Não informado; D2EHPA: ácido 2-etil-hexil fosfônico; MWCNT: Nanotubos de carbono de parede múltipla; LL-ISS-SPE: extração de fase sólida baseada em surfactante sem ligantes e in situ; Surfactante cationico: Brometo de n-dodeciltrimetilamônio; SPE: extração em fase solida; PPT: ponta de pipeta para fase sólida; MdSPE: extração em fase sólida magnética dispersiva; F AAS: espectrometria de absorção atômica com chama.

A precisão do método proposto foi avaliada em termos de precisão intra-dia ( $n=10$ ) pela repetibilidade do sinal de absorvância dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de 7,0 e 80,0 de íons  $\text{Cu}^{2+} \mu\text{g L}^{-1}$  na ausência e presença de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de BSA, obtendo desvios padrão relativos (DPR) de 6,58% e 4,02% para íons  $\text{Cu}^{2+}$  e 8,57 e 4,34% para  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ), respectivamente. Além disso, a precisão inter-dia ( $n=2$ ) foi avaliada nos mesmos níveis de concentração para íons  $\text{Cu}^{2+}$  usados na análise intra-dia. O DPR obtido foi de 6,99 e 4,12% para íons  $\text{Cu}^{2+}$  e 7,57 e 6,08% para  $\text{Cu}^{2+}$ -BSA( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ), respectivamente.

### 5.9 ESTUDO DE ÍONS INTERFERENTES

Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 50. De forma geral, pode-se observar que os íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e citrato não interferem na pré-concentração dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  na presença e/ou ausência de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de BSA, obtendo-se porcentagens toleráveis de recuperação do sinal analítico do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na faixa de 91,7 - 110,8%. No entanto, os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram considerados íons que interferem na pré-concentração do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , tanto na presença como na ausência da proteína BSA, obtendo porcentagens de recuperação na faixa de 70,2 - 84,3% e 117,6 - 194,9%.

**Figura 50.** Efeito dos íons interferentes na porcentagem de recuperação do sinal analítico de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e presença e de BSA  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ .

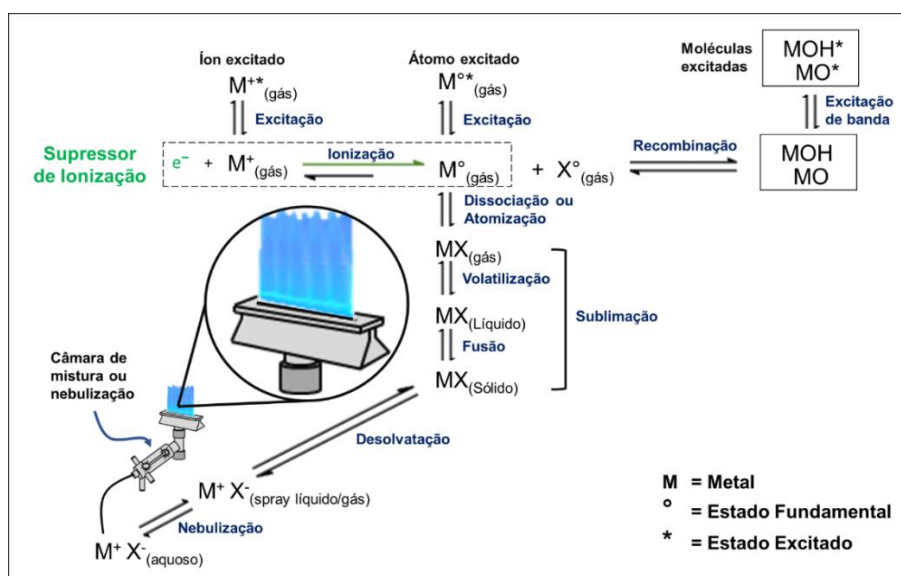


Condições:  $\text{Cu}^{2+}$  ( $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $83,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Al}^{3+}$  ( $77,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  ( $183,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $200,0 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $20,8 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{K}^+$  ( $268,3 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Na}^+$  ( $81,7 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Cl}^-$  ( $163,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) e citrato ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ). Condições otimizadas:  $50,0 \text{ mg}$  do polímero IIP-HEMA-BSA( $\text{ACN}$ ); Vazão de Pré-concentração:  $7,6 \text{ mL min}^{-1}$ ; pH: 4,50 sem tampão; Eluente:  $\text{HCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$ .

Na ausência da BSA (Figura 50), os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  interferiram positivamente na pré-concentração dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ , observando-se um aumento significativo do sinal analítico em 30,0% e 17,0%, respectivamente. Este comportamento foi atribuído à força iônica da solução e à energia de ionização do Ca e Mg. Assim, a variação da força iônica da solução pela presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , produz mudanças conformacionais na estrutura secundária e terciária da proteína BSA imobilizada na superfície do IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> durante a etapa de pré-concentração. Estas mudanças conformacionais, em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína, promovem maior exposição das pontes dissulfeto e desprotonação dos grupos carboxílicos [207,213]. Conseqüentemente, há mais sítios de ligação que interagem e retêm os íons  $\text{Cu}^{2+}$ , incrementando o sinal analítico após a etapa de pré-concentração.

Por outro lado, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  durante a etapa de pré-concentração podem interagir com a proteína BSA imobilizada na superfície do polímero, e uma vez eluidos junto com o íon Cu, aumentam o sinal analítico durante a atomização. Este fato se deve às energias de ionização do Ca ( $1145,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) e Mg ( $1450,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [229], que são valores menores em comparação à energia de ionização do Cu ( $1958,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Assim, Ca e Mg atuam como supressores de ionização do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , disponibilizando maior número de elétrons e deslocando o equilíbrio de ionização do íon  $\text{Cu}^{2+}$  para sua forma atômica (Figura 51), o que intensifica o sinal analítico (absorbância).

**Figura 51.** Esquema resumido do processo de formação de átomos metálicos no nebulizador e na chama.



Fonte: o próprio autor

Referente à presença da BSA em solução, obteve-se um incremento de 95,0% do sinal analítico do íon  $\text{Cu}^{2+}$  na presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , entretanto, foi observada uma diminuição de 30,0%, 16,0%, e 23,0% na presença dos íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , respectivamente. No primeiro caso, o Ca por ser bivalente (2+) pode interagir com a BSA em solução (Ca-BSA) [230] e ao mesmo tempo com a superfície do polímero, formando uma ponte entre o polímero e a proteína “polímero-Ca-BSA”. A ponte formada favorece a retenção dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e, portanto, o aumento do sinal analítico, uma vez que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  pode se ligar com a BSA imobilizada na superfície do polímero, bem como, com a proteína da ponte “polímero-Ca-BSA”. Além disso, o cálcio retido no polímero (polímero-Ca-BSA) atua como supressor de ionização, após a etapa de eluição, favorecendo a atomização e o aumento do sinal analítico do Cu.

Por outro lado, a recuperação do sinal analítico dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  na presença de BSA(0,5 g L<sup>-1</sup>) e dos íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , foi entre 70,0 a 84,0%. Neste caso, esses íons por serem monovalentes, não podem formar a ponte como acontece com o íon  $\text{Ca}^{2+}$ , mas sua presença na solução altera a força iônica do meio. Assim, a solubilidade da proteína ligada ao Cu ( $\text{Cu}^{2+}$ -BSA) diminui e, conseqüentemente, a transferência de massa de íons  $\text{Cu}^{2+}$  para a superfície do polímero é menor, obtendo-se diminuição do sinal analítico.

Da mesma forma, a diminuição do sinal analítico do íon Cu na presença dos íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  também pode ser atribuída à competição entre esses íons com os íons  $\text{Cu}^{2+}$  pelos sítios de ligação.

Ademais, na Figura 50 pode-se observar que a pré-concentração da solução contendo os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e todos os íons interferentes (mistura), foi ligeiramente influenciada negativamente pela presença da proteína BSA, obtendo-se uma porcentagem de recuperação de 79,0% do sinal analítico. Contudo, mesmo que alguns íons apresentem interferência na pré-concentração do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , se espera que o efeito de interferência seja menor nas amostras de leite devido à disposição e/ou forma como estão ligados os íons na matriz alimentícia.

#### 5.10 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE LEITE

O método proposto foi aplicado para determinar a concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes marcas de leite bovino e leite de soja. Como apresentado no Quadro 8, todas as amostras de leite, independentemente do tipo (integral, desnatado, zero lactose ou zero açúcar) ou da origem (bovino e soja), apresentaram composição

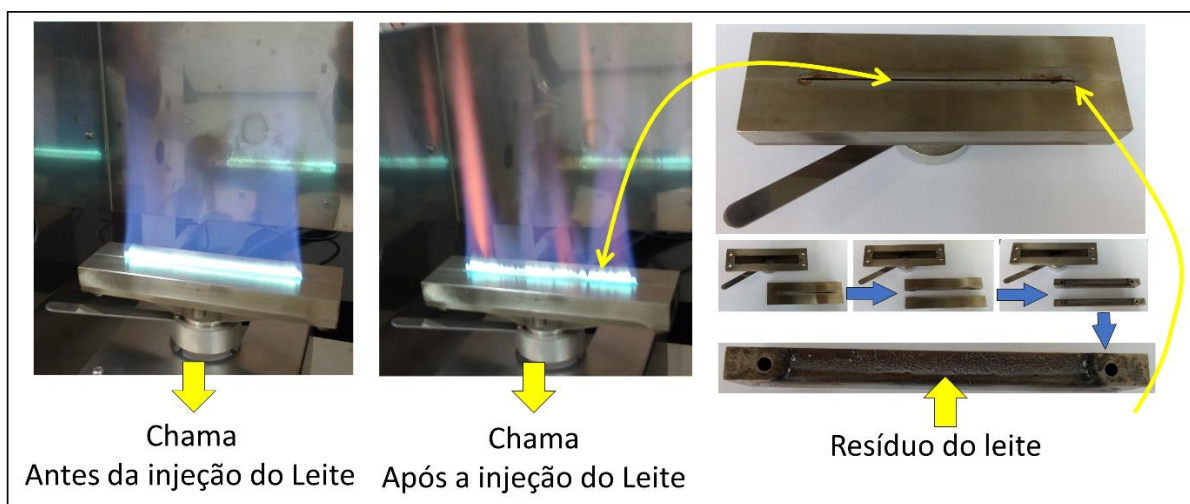
nutricional similar (informada pelos fabricantes), com valor de pH entre 6,45 e 7,28 (verificado experimentalmente,  $n = 3$ ).

Dentre as amostras adquiridas em supermercado local, apenas uma delas (M2-Bov-Int) reporta a concentração de Cu na tabela de valor nutricional. Embora essa concentração ( $675,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu) seja quantificável pela aspiração direta no F AAS, experimentalmente foi observado que os carboidratos, proteínas, gorduras e outros presentes no leite bovino interferiram na atomização e quantificação do Cu. Por tanto, foram empregadas diferentes estratégias, tais como diluição da amostra e precipitação de proteína, com intuito de reduzir os efeitos de interferência.

Para isto, inicialmente a amostra M2-Bov-Int foi aspirada diretamente no F AAS nas seguintes condições: **(a)** leite puro, **(b)** leite:água 75,0: 25,0 (% v/v), **(c)** leite:água 50,0:50,0 (% v/v) **(d)** leite:água 25,0:75,0 (% v/v) e **(e)** leite:água 10,0:90,0 (% v / v). A concentração do Cu foi determinada por meio de uma curva analítica construída em água ultrapura na faixa de concentração de  $0,10$  a  $4,00 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , com equação linear de  $\text{Abs} = 0,0885 \pm 0,0004 (\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}) [\text{Cu}^{2+}, (\mu\text{g L}^{-1})] + 0,0070$  e  $r = 0,999$ . As porcentagens de recuperação de Cu, em relação à concentração reportada pelo fabricante, foram 78,7% **(a)**, 67,0% **(b)**, 89,3% **(c)**, 82,9% **(d)** e 0,0% **(e)**.

As porcentagens 89,3% e 82,9% podem ser consideradas satisfatórias por se tratar de uma amostra complexa. Entretanto, quando foram empregadas as diluições **(c)** 50,0:50,0 (leite:água,% v/v) e **(d)** 25,0:75,0 (leite:água,% v/v) ocorreu entupimento da mangueira de drenagem do equipamento e a descontinuidade da chama pelo acúmulo de leite na cabeça do queimador (Figura 52), obtendo-se diminuição do sinal analítico dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  (absorbância) e, conseqüentemente, mau funcionamento do F AAS.

**Figura 52.** Efeito da aspiração direta do leite nas seguintes diluições: 50,0:50,0 (leite:água, % v/v) e 25,0:75,0 (leite:água, % v/v) na descontinuidade da chama pelo acúmulo de leite na cabeça do queimador.



**Fonte:** o próprio autor

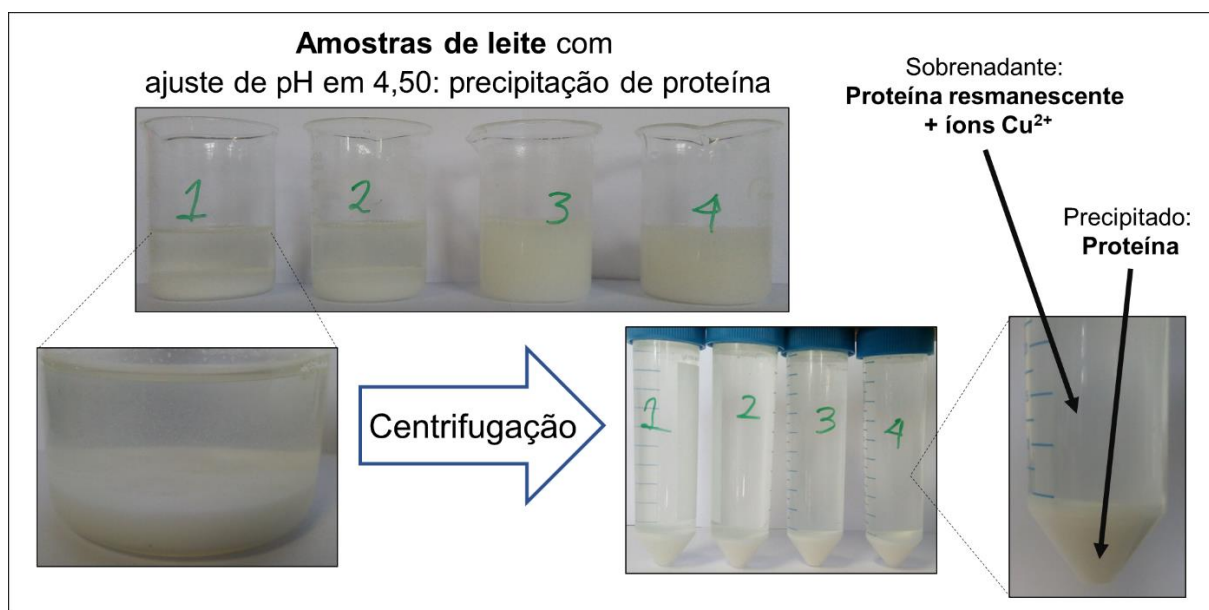
As diluições **c** e **d** também foram realizadas com precipitação de proteína em pH 4,50 com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em que a concentração de Cu foi calculada por meio da curva analítica  $Abs = 0,0885 \pm 0,0004 (Abs L \mu g^{-1}) [Cu^{2+}, (\mu g L^{-1})] + 0,0070$  com  $r = 0,999$ , construída em água ultrapura, obtendo-se porcentagens de recuperação de Cu de 123,9% e 118,3%, respectivamente, em comparação com o valor reportado pelo fabricante. Nesse caso, o aumento do sinal analítico obtido com a precipitação de proteína nas diluições **c** e **d** pode ser atribuído à maior disponibilidade do cálcio no sobrenadante, apresentando efeito de interferência positiva como foi observado no estudo de interferentes. Cabe salientar que esse efeito de matriz poderia ser corrigido empregando o método de adição de padrão. No entanto, esse procedimento torna-se inviável como análise de rotina devido ao tempo da análise e por requer maior quantidade de amostra para a construção da curva analítica.

Como exposto, os resultados obtidos na determinação direta do Cu na amostra de M2-Bov-Int revelam que é necessário empregar etapas de preparo da amostra ou adoção de estratégias de *clean-up* para viabilizar a análise e a determinação de Cu em amostras de leite bovino, o que justifica o objetivo desta Tese.

Desta forma, um fator de diluição de 10 vezes das amostras de leite com precipitação da proteína (Figura 53) [22,150-152], como consequência do ajuste do pH em 4,50 na ausência de tampão, foram os processos adotados para o preparo e *clean-up* da amostra, a fim de evitar entupimento e pressão na minicoluna durante a

pré-concentração *on-line* em sistema FIA-F AAS. É importante mencionar que, embora a amostra tenha sido diluída 10 vezes e que a maior parte da proteína foi eliminada pelo efeito da precipitação, ainda o sobrenadante contém proteína, uma vez que o espectro UV-Vis ( $\lambda_{\text{máx}} = 278 \text{ nm}$ ) desse sobrenadante mostrou um sinal de absorvância similar ao obtido com a solução de BSA na concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ .

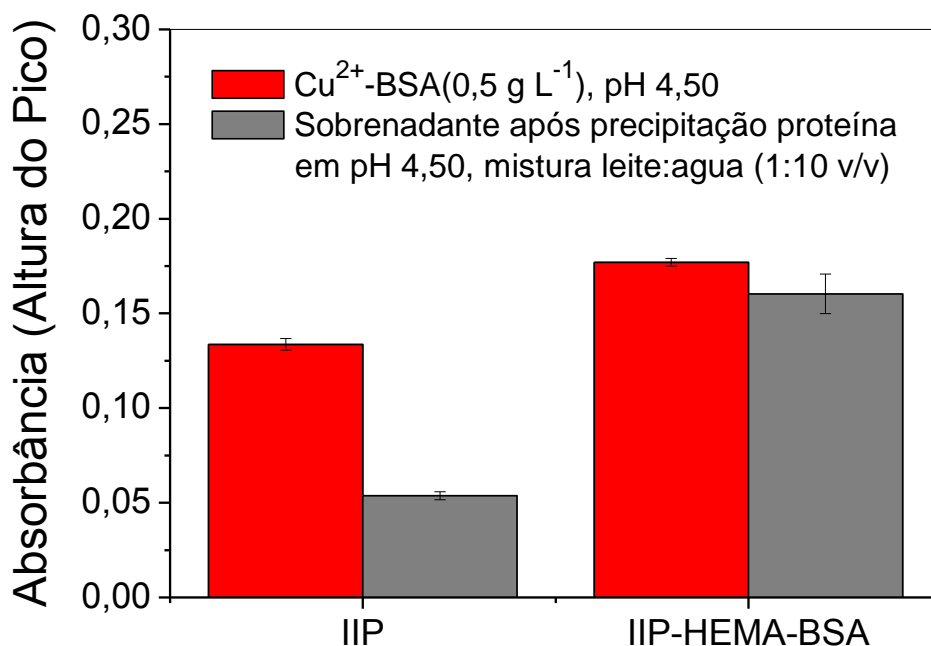
**Figura 53.** Amostras de leite bovino e soja após ajuste de pH em 4,50 e centrifugadas.



**Fonte:** o próprio autor

Cabe salientar que, após o processo de precipitação os íons  $\text{Cu}^{2+}$  permanecem no sobrenadante, interagindo com a proteína remanescente. Este fato foi constatado com a pré-concentração *on-line* do sobrenadante no sistema FIA-F AAS utilizando um polímero impresso para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  sem modificação de superfície [IIP<sub>(ACN)</sub>]. Por meio deste experimento foi possível observar que o sinal analítico do íon  $\text{Cu}^{2+}$  obtido com o polímero IIP<sub>(ACN)</sub> foi 66,3% menor quando comparado ao sinal obtido com o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> (Figura 54). Assim, este resultado confirma que proteína remanescente, após a precipitação, interfere na pré-concentração dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  quando utilizado um polímero sem meios de acesso restrito (RAM), e que o polímero  $\text{Cu}^{2+}$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> tem potencial para exclusão de proteínas.

**Figura 54.** Determinação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em amostra de leite bovino M2-Bov-Int, após a precipitação de proteína em pH 4,50 com HCl e utilizando os polímeros IIP<sub>(ACN)</sub> e IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>.



Condições: massa dos polímeros: 50,0 mg; concentração da solução padrão de Cu-BSA: 67,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e 0,5 g L<sup>-1</sup> de BSA; volume de pré-concentração: 20,0 mL; vazão de pré-concentração/eluição: 7,6 mL min<sup>-1</sup>; Eluente: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup>.

As concentrações dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  encontradas nas amostras de leite (bovino e soja), empregando o método de digestão ácida assistida por micro-ondas com pré-concentração/determinação *on-line* usando o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS, e as porcentagens de recuperação obtidas com o teste de adição/recuperação, estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Concentração de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontrada em diferentes marcas de leite bovino (integral, desnatado, zero lactose e) e leite de soja (integral e zero açúcar) empregando o método de digestão ácida assistida por micro-ondas e o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS. Os dados correspondem à média de  $n = 3$ .

Amostras	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		% Recuperação
	Quantidade adicionada	Quantidade encontrada $\pm$ DP	
M1-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,195 $\pm$ 0,006	102,4
M1-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,185 $\pm$ 0,011	97,3
M2-Bov-Int	0	0,652 $\pm$ 0,027	-
	0,650	1,348 $\pm$ 0,027	103,1
M2-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,206 $\pm$ 0,010	108,5
M3-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,189 $\pm$ 0,008	99,3
M3-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,198 $\pm$ 0,006	104,2
M4-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,208 $\pm$ 0,007	109,4
M4-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,187 $\pm$ 0,004	98,6
M5-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,206 $\pm$ 0,007	108,6
M5-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,198 $\pm$ 0,006	104,2
M6-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,189 $\pm$ 0,008	99,5
M6-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,198 $\pm$ 0,007	104,0
M7-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,203 $\pm$ 0,002	107,0
M7-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,183 $\pm$ 0,006	96,4
M8-Bov-Int	0	<LQ	-
	0,190	0,190 $\pm$ 0,008	100,0
M8-Bov-Des	0	<LQ	-
	0,190	0,192 $\pm$ 0,010	101,0
M8-Bov-Zlac	0	<LQ	-
	0,190	0,191 $\pm$ 0,010	100,4
M9-Bov-Zlac	0	<LQ	-
	0,190	0,192 $\pm$ 0,009	101,0
M10-Soja-Int	0	0,080 $\pm$ 0,008	-
	0,190	0,300 $\pm$ 0,014	111,3
M11-Soja-Int	0	0,056 $\pm$ 0,004	-
	0,190	0,274 $\pm$ 0,008	111,4
M12-Soja-Int	0	0,084 $\pm$ 0,008	-
	0,190	0,311 $\pm$ 0,006	113,4
M12-Soja-Int*	0	0,080 $\pm$ 0,008	-
	0,190	0,304 $\pm$ 0,010	112,6

DP: desvio padrão, M: marca, Bov: bovino, Int: leite integral, Des: leite desnatado, Zlac: leite zero lactose, \*Zero açúcar.

Conforme observado na Tabela 8, foi encontrado Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) apenas na amostra M2-Bov-Int de leite bovino, como era esperado, e também para as 4 amostras de leite de soja. Por esse motivo, as amostras M2-Bov-Int, M10-Soja-Int, M11-Soja-Int, M12-Soja-Int e M12-Soja-Int\* (sem açúcar) foram preparadas empregando o procedimento do método proposto (seção 4.12.3), com posterior pré-concentração/determinação *on-line* com o polímero IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS, nas condições otimizadas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Concentração de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontrada em amostras de leite bovino e leite de soja empregando o método proposto sem digestão ácida e o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> no sistema FIA-F AAS. Os dados correspondem à média de  $n = 3$ .

Amostras	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		% Recuperação
	Quantidade Adicionada	Quantidade encontrada $\pm$ DP	
M2-Bov-Int	0	0,635 $\pm$ 0,042	-
	0,190	0,845 $\pm$ 0,031	102,4
M10-Soja-Int	0	0,077 $\pm$ 0,003	-
	0,190	0,275 $\pm$ 0,010	102,9
M11-Soja-Int	0	0,052 $\pm$ 0,004	-
	0,190	0,247 $\pm$ 0,013	102,1
M12-Soja-Int	0	0,091 $\pm$ 0,003	-
	0,190	0,302 $\pm$ 0,009	107,5
M12-Soja-Int*	0	0,083 $\pm$ 0,010	-
	0,190	0,295 $\pm$ 0,006	108,1

DP: desvio padrão, M: marca, Bov: bovino, Int: leite integral, Des: leite desnatado, Zlac: leite zero lactose; \*Zero açúcar.

A concentração de Cu encontrada nas amostras M2-Bov-Int, M10-Soja-Int, M11-Soja-Int, M12-Soja-Int e M12-Soja-Int\* (sem açúcar) empregando o método de digestão ácida assistida por micro-ondas com pré-concentração/determinação *on-line* no sistema FIA-F AAS, não apresentaram diferença significativa com a concentração encontrada com o método proposto em nível de 95,0% de confiança segundo o teste t pareado, uma vez que os valores do t calculado foram menores que os tabulados ( $t_{2,95,0\%} = 4,30$ ), como apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Teste t pareado aplicado às concentrações de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontradas nas amostras de leite bovino e soja pelo método de digestão assistida por micro-ondas, bem como pelo método proposto, com pré-concentração *on-line* empregando o IIP-HEMA-BSA em sistema FIA-F AAS. Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de  $n = 3$ .

Amostras	Método		t calculado
	Micro-ondas $\text{mg kg}^{-1}\pm\text{DP}$	Proposto $\text{mg kg}^{-1}\pm\text{DP}$	
M2-Bov-Int	0,652 $\pm$ 0,027	0,635 $\pm$ 0,042	0,69
M10-Soja-Int	0,080 $\pm$ 0,008	0,077 $\pm$ 0,003	0,85
M11-Soja-Int	0,056 $\pm$ 0,004	0,052 $\pm$ 0,004	0,82
M12-Soja-Int	0,084 $\pm$ 0,008	0,091 $\pm$ 0,003	1,25
M12-Soja-Int*	0,080 $\pm$ 0,008	0,083 $\pm$ 0,010	1,15

DP: desvio padrão, M: marca, Bov: bovino, Int: leite integral, \*Zero açúcar.

Da mesma forma, a concentração de Cu encontrada na amostra M2-Bov-Int pelo método proposto foi estatisticamente similar à concentração reportada na tabela de valor nutricional pelo fabricante, com nível de confiança de 95,0% (teste t). Por outro lado, as concentrações de Cu encontradas nas amostras de leite analisadas (Tabela 9) estão dentro do valor máximo estabelecido pela legislação internacional da Organização do Comércio Externo do Japão - JETRO ( $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) [16] e acima do valor máximo estabelecido pela Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças - ATSDR ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) [12].

Foram obtidas porcentagens de recuperação entre 96,4-113,4% de íons  $\text{Cu}^{2+}$  a partir do teste de adição/recuperação empregando os dois tipos de análise para o preparo das amostras de leite (digestão ácida assistida por micro-ondas e método proposto), que foram consideradas satisfatórias. Além disso, a exatidão do método proposto também foi avaliada comparando os resultados das concentrações de Cu encontradas pelo método proposto com as concentrações empregando a digestão ácida assistida por micro-ondas e determinação por GF AAS, como técnica de referência. Assim, não foi observada diferença significativa entre os valores de acordo com o teste t pareado ao nível de 95,0 % de confiança, como apresentado na Tabela 11.

**Tabela 11.** Teste t pareado aplicado às concentrações de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontradas nas amostras de leite bovino e soja pelo sistema FIA-F AAS e GF AAS. Os dados correspondem à média de  $n = 3$ .

Amostras	Técnica		t calculado
	FIA-F AAS $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{DP}$	GF AAS $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{DP}$	
M2-Bov-Int	0,635 $\pm$ 0,042	0,643 $\pm$ 0,006	0,31
M10-Soja-Int	0,077 $\pm$ 0,003	0,074 $\pm$ 0,004	0,72
M11-Soja-Int	0,052 $\pm$ 0,004	0,055 $\pm$ 0,002	1,29
M12-Soja-Int	0,091 $\pm$ 0,003	0,086 $\pm$ 0,004	2,52
M12-Soja-Int*	0,083 $\pm$ 0,010	0,081 $\pm$ 0,004	0,24

DP: desvio padrão, M: marca, Bov: bovino, Int: leite integral, \*Zero açúcar, GF AAS: espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

Embora Abollino e colaboradores [22] tenham observado que 53,7% do Cu presente no leite bovino co-precipita com a proteína em pH 4,83 (PIE da caseína), neste trabalho foi possível a determinação de Cu total em amostras de leite após a precipitação da proteína em pH 4,50 conforme os resultados da exatidão do método, avaliada por meio dos testes de adição/recuperação e pela técnica de referência GF AAS. Vale salientar que abaixo do  $\text{pH}_{\text{PIE}}$  (4,70-5,60), as proteínas adquirem carga positiva ( $\text{H}_3\text{N}^+$ ) e geram repulsão com os íons  $\text{Cu}^{2+}$ , deixando-os disponíveis na sua forma livre no sobrenadante. No entanto, nem todo o Cu está na forma livre, pois uma fração permanece complexada com a proteína resmanescente no sobrenadante, como foi observado no respectivo espectro UV-Vis ( $\lambda_{\text{máx}} = 278 \text{ nm}$ ). Desta forma, foi possível evidenciar a importância dos polímeros ionicamente impressos contendo acesso restrito (IIP-RAM), pois além de reter o Cu na forma livre (íons  $\text{Cu}^{2+}$ ), também apresentam capacidade para reter o Cu complexado ( $\text{Cu}^{2+}$ -BSA) excluindo as proteínas, conforme foi observado na Figura 54, o qual permitiu a determinação de Cu total nas amostras de leite.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados desta Tese revelaram que a adsorção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  nos polímeros impressos depende fortemente da polaridade do solvente porogênico usado durante a polimerização. Assim, os polímeros sintetizados na presença de ACN apresentaram maior porosidade e características hidrofílicas em comparação com os sintetizados em EtOH, e como consequência, maior capacidade de retenção de íons  $\text{Cu}^{2+}$ .

O polímero  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  apresentou capacidade para reter seletivamente os íons  $\text{Cu}^{2+}$  de forma mais eficaz do que seu respectivo polímero não impresso (NIP). No entanto, a impressão química nos polímeros  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  e  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  diminui com a presença do co-monomero hidrofílico 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e, especialmente, da proteína albumina de soro bovino (BSA), que foram utilizados como meios de acesso restrito para exclusão de proteínas.

Todos os polímeros, com e sem modificador de superfície, têm a capacidade de excluir a proteína BSA em meio aquoso, porém, nem todos podem reter a mesma quantidade de  $\text{Cu}^{2+}$  quando este íon está em solução com a BSA.

Em pH 4,50 e na ausência de tampão, o  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  foi o polímero mais eficiente para a pré-concentração e determinação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com simultânea exclusão de proteína BSA em amostras de leite bovino e leite de soja. Além disso, este polímero pode ser reutilizado durante 450 ciclos de pré-concentração e eluição, sem qualquer diminuição do sinal analítico (absorbância) do  $\text{Cu}^{2+}$ .

Os parâmetros analíticos como limite de detecção, limite de quantificação e fator de pré-concentração, obtidos nas condições otimizadas no sistema FIA-F AAS por meio de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com um ponto central em triplicata, foram considerados satisfatórios em relação com os dados reportados na literatura para pré-concentração de Cu usando SPE com determinação por FIA-F AAS.

A exatidão, avaliada a partir das recuperações de íons  $\text{Cu}^{2+}$  obtidas por meio do teste de adição/recuperação nas amostras, assim como pela comparação entre as concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  determinadas pelo método proposto e pela técnica de referência GF AAS, revelou que o método proposto é confiável.

A combinação das propriedades dos IIP e dos RAM, em um único material adsorvente, permitiu reter os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e excluir simultaneamente macromoléculas para a quantificação de Cu total (livre e complexado) nas amostras de leite bovino e

leite de soja, empregando um mínimo de pré-tratamento das amostras. Desta forma, o IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> acoplado ao sistema FIA-F AAS pode ser considerado um método simples, rápido e de baixo custo quando comparado com os tratamentos comuns baseados na digestão ácida assistida por micro-ondas para a determinação de Cu total em amostras de leite.

## 7. PERSPECTIVAS

Em futuros estudos relacionados à síntese de IIP-RAM, pode ser avaliada a concentração do co-mônômero HEMA e da proteína BSA imobilizada no IIP, com intuito de evitar a redução da seletividade do polímero impresso. Do mesmo modo, poderiam ser avaliados outros monômeros funcionais e sua estequiometria, além de outros co-mônômeros hidrofílicos como meios de acesso restrito para o preparo de IIP-RAM empregando diferentes estratégias de síntese.

Na síntese de IIP-RAM, poderiam ser utilizados monômeros funcionais que ao complexar os íons metálicos formem um complexo metálico cromóforo, em que a determinação do metal possa ser realizada por meio de um espectrofotômetro.

Além disso, a especiação química do Cu também poderia ser estudada empregando o IIP e IIP-RAM com variação de pH do meio, a fim de determinar a quantidade de Cu livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e complexada, para fornecer informação sobre a biodisponibilidade deste micronutriente nas amostras do leite bovino e leite de soja.

## REFERÊNCIAS

- [1] Duffus, J. H. Heavy metals” - a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.
- [2] Barakat, M. A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 361–377, 2011.
- [3] Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Faa, G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 876-889, 2010.
- [4] Mandal, S.; Das, G.; Singh, R.; Shukla, R.; Bharadwaj, P. K. Synthesis and studies of Cu (II)-thiolato complexes: bioinorganic perspectives. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 160, p. 191-235, 1997.
- [5] Belle, C.; Rammal, W.; Pierre, J-L. Sulfur ligation in copper enzymes and models. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1929–1936, 2005.
- [6] Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, 797S-811S, 1996.
- [7] Nutrient Requirements of Dairy Cattle (NRC). **Subcommittee on dairy Cattle nutrition, committee on animal nutrition board on agriculture and natural resources national research council**. 7<sup>a</sup> ed. Washington, D. C: National Academy Press, 2001. p. 133-136.
- [8] WHO - World Health Organization. **Trace elements in human nutrition and health**. **World Health Organization**, 1996. Disponível em: < <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>>. Acesso em: 22 nov. 2018.
- [9] Delves, H. T. Dietary sources of copper. In: **Biological Roles of copper**. Ciba Foundation Symposium, v. 79 (new series). Amsterdam: Excerpta Medica, 1980. p. 5-22.
- [10] Vincevica-Gaile, Z.; Klavins, M. Transfer of metals in food chain: an example with copper and Lettuce. **Environmental and Climate Technologies**, v. 10, p. 21-24, 2012.
- [11] Yavuz, E.; Tokalioğlu, Ş.; Patat, Ş. Core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> polydopamine nanoparticles as sorbent for magnetic dispersive solid-phase extraction of copper from food samples. **Food Chemistry**, v. 263, p. 232-239, 2018.
- [12] ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for copper**. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2018

[13] CODEX Alimentarius JECFA. International Food Standard. **Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF**. 10th Session Rotterdam, The Netherlands, p.144-146, 2016.

[14] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>> Acesso em: 5 out. 2018

[15] Ministério da Saúde. Portaria 685 de 1998 do Ministério de Saúde (Secretaria de Vigilância Sanitária). **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](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/anexo/anexo_prt0685_27_08_1998.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2019

[16] JETRO - Japan external trade organization. **Specifications and Standards for Foods, Food Additives, etc. Under the Food Sanitation Act (Abstract)**, 2010. Disponível em: <[https://www.jetro.go.jp/ext\\_images/en/reports/regulations/pdf/foodext2010e.pdf](https://www.jetro.go.jp/ext_images/en/reports/regulations/pdf/foodext2010e.pdf)>. Acesso em: 09 out. 2018.

[17] USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Ground Water and Drinking Water**, 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants#one>> Acesso em: 2 out. 2018

[18] WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**, 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/)>. Acesso em: 2 out. 2018

[19] CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução No 357, de 17 de março de 2005**, Disponível em: <[http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO\\_CONAMA\\_n\\_357.pdf](http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf)> Acesso em: 5 out. 2018

[20] CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução No 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>> Acesso em: 5 out. 2018

[21] CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução No 420, de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>> Acesso em: 5 out. 2018

[22] Abollino, O.; Aceto, M.; Bruzzoniti, M.; Mentasti, E.; Sarzanini, C. Speciation of copper and manganese in milk by solid-phase extraction/inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 375, n. 3, p. 299-306, 1998.

- [23] Oreste, E. Q.; Souza, A. O.; Pereira, C. C.; Lisboa, M. T.; Cidade, M. J. A.; Vieira, M. A.; Cadore, S.; Ribeiro, A. S. Evaluation of sample preparation methods for the determination of Ca, Cu, Fe, K, and Na in milk powder samples by ICP-OES. *Food Analytical Methods*, v. 9, n. 3, p. 777-784, 2015.
- [24] Babu, A. J.; Supriya, R. A.; Swetha, C. S.; Suganya, G.; Reddy, G. V.; Sasikala, V.; Surendra, R.; Sreenivas, K. Y. Estimation of chromium, copper and lead in milk by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in Tirupati, Andhra Pradesh. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 8, p. 90-93, 2018.
- [25] Chajduk, E.; Pyszynska, M.; Polkowska-Motrenko, H. Determination of trace elements in infant formulas available on polish market. **Biological Trace Element Research**, 2018. Doi:10.1007/s12011-018-1339-5.
- [26] Hoque, M. I. U.; Chowdhury, D. A.; Holze, R.; Chowdhury, A-N.; Azam, M. S. Modification of Amberlite XAD-4 resin with 1,8-diaminonaphthalene for solid phase extraction of copper, cadmium and lead, and its application to determination of these metals in dairy cow's milk. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, p. 831-842, 2015.
- [27] Gamela, R. R.; Duarte, A. T.; Barrera, E. G.; Welz, B.; Dessuy, M. B.; Messias da Silva, M.; Vale, M. G. R. Development of analytical methods for the determination of copper and manganese in infant formula using high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Analytical Methods**, v. 9, n. 15, p. 2321-2327, 2017.
- [28] Nascentes, C. C.; Arruda, M. A. Z.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, p. 912-917, 2004.
- [29] Xiang, G.; Wen, S.; Jiang, X.; Liu, X.; He, L. Determination of Trace Copper(II) in Food Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Cloud Point Extraction. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, p. 101-107, 2011.
- [30] Xiang, G.; Zhang, Y.; Jiang, X.; He, L.; Fan, L.; Zhao, W. Determination of trace copper in food samples by flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on modified soybean hull. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 521-525, 2010.
- [31] Tobiasz, A.; Walas, S. Solid-phase-extraction procedures for atomic spectrometry determination of copper. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p.106-122, 2014.
- [32] Alpdogan, G.; Zor, S. D.; Peksel, A. Analysis of some trace metals in milk samples by FAAS After preconcentration by *Aspergillus niger* loaded on TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, p. 642-650, 2016.

- [33] Samanta, G.; Chowdhury, T. R.; Mandal, B.K.; Biswas, B. K.; Chowdhury, U. K.; Basu, G. K.; Chanda, C. R.; Lodh, D.; Chakraborti, D. Flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of arsenic in water and biological samples from arsenic-affected districts of west Bengal, India, and Bangladesh. **Microchemical Journal**, v. 62, p. 174-191, 1999.
- [34] Molaei, K.; Bagheri, H.; Asgharinezhad, A. A.; Ebrahimzadeh, H.; Shamsipur, M. SiO<sub>2</sub>-coated magnetic graphene oxide modified with polypyrrole–polythiophene: A novel and efficient nanocomposite for solid phase extraction of trace amounts of heavy metals, **Talanta**, v. 167, p. 607-616, 2017.
- [35] Garg, B. S.; Sharma, R. K.; Bist, J. S.; Bhojak, N.; Mittal, S. Separation and preconcentration of metal ions and their estimation in vitamin, steel and milk samples using o-vanillin-immobilized silica gel. **Talanta**, v. 48, p. 49-55, 1999.
- [36] Kyzas, G. Z.; Fu, J.; Matis, K. A. New biosorbent materials: selectivity and bioengineering insights. **Processes**, v. 2, p. 419-440, 2014.
- [37] Marestoni, L. D.; Segatelli, M. G.; Sotomayor, M. P. T.; Sartori, L. R.; Tarley, C. R. T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194-1207, 2013.
- [38] Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 141-156, 2004.
- [39] Nishide, H.; Deguchi, J.; Tsuchida, E. Selective adsorption of metal ions on crosslinked poly(vinylpyridine) resin prepared with a metal ion as a template. **Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 169-174, 1976.
- [40] Pauling, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643-2657, 1940.
- [41] Figueiredo, E. C.; Dias, A. C. B.; Arruda, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.
- [42] Wulff, G.; Sarhan, A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 11, n. 4, p. 341, 1972.
- [43] Takagishi, T.; Klotz, I. M. Macromolecule-small molecule interactions; Introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. **Biopolymers**, v. 11, n. 2, p. 483-491, 1972.
- [44] Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. P. T.; Kubota, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

- [45] Haupt, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, **Analyst**, v. 126, p. 747-756, 2001.
- [46] Branger, C.; Meouche, W.; Margailan, A. Recent advances on ion-imprinted polymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 859-875, 2013.
- [47] Wackerlig, J.; Schirhagl, R. Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: a review. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 250-261, 2016.
- [48] Souza, I. D.; Melo, L. P.; Jardim, I. C. S. F.; Monteiro, J. C. S.; Nakano, A. M. S.; Queiroz, M. E. C. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 49-59, 2016.
- [49] Prasada, R. T.; Daniel, S.; Gladis, J. M. Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 28-35, 2004.
- [50] Shakerian, F.; Kim, K-H.; Kwon, E.; Szulejko, J. E.; Kumard, P.; Dadfarnia, S.; Shabani, A. M. H. Advanced polymeric materials: synthesis and analytical application of ion imprinted polymers as selective sorbents for solid phase extraction of metal ions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 55-69, 2016.
- [51] Hagestam, I. H.; Pinkerton T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1757-1763, 1905.
- [52] Desilets, C. P.; Rounds, M. A.; Regnier, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 544, p. 25-39, 1991.
- [53] Cassiano, N. M.; Lima, V. V.; Oliveira, R. V.; Pietro, A. C.; Cass, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1462-1469, 2006.
- [54] Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Puoci, F.; Iemma, F.; Spizzirri, U. G.; Picci, N. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, p. 355-362, 2010.
- [55] Oliveira, F. M.; Segatelli, M. G.; Tarley, C. R. T. Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples. **Analytical Methods**, v. 8, p. 656-665, 2016.
- [56] Moraes, G. O. I.; Silva, L. M. R.; Santos-Neto, A. J.; Florenzano, F. H.; Figueiredo, E. C. 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**, v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013.

- [57] Acquaro, V. R. J.; Domingues, D. S.; Costa, M. E. Q. Column switching UHPLC-MS/MS with restricted access material for the determination of CNS drugs in plasma samples. **Bioanalysis**, v. 9, n. 6, p. 555-568, 2017.
- [58] Rodríguez, G. E.; García, G. D.; Carabias, M. R. Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 40-48, 2010.
- [59] Huclová, J.; Satínský, D.; Maia, T.; Karlíček, R.; Solich, P.; Araújo, A. N. Sequential injection extraction based on restricted access material for determination of furosemide in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, n. 1-2, p. 245-251, 2005.
- [60] Chico, J.; Meca, S.; Companyó, R.; Prat, M. D.; Granados, M. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. Application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, p. 1-8, 2008.
- [61] Faria H. D.; Abrão, L. C. C.; Santos, M. G.; Barbosa, A. F.; Figueiredo, E. C. New advances in restricted access materials for sample preparation: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 959, p. 43-65, 2017.
- [62] Haginaka, J.; Takehira, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (s)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 331-339, 1999.
- [63] Du, B.; Qu, T.; Chen, Z.; Cao, X.; Han, S.; Shen, G.; Wang, L. A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. **Talanta**, v. 129, p. 465-472, 2014.
- [64] Oliveira, F. M.; Segatelli, M. G.; Tarley, C.R.T. Evaluation of a new water-compatible hybrid molecularly imprinted polymer combined with restricted access for the selective recognition of folic acid in binding assays. **Journal of Applied Polymer Science**, 2016.
- [65] Sanbe, H.; Haginaka, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of b-blockers in biological fluids. **Analyst**, v. 128, n. 6, p. 593-597, 2003.
- [66] Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O. I.; Spizzirri, U. G.; Picci, N. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1634-1640, 2009.
- [67] Santos, M. G.; Moraes, G. O. I.; Nakamura, M. G.; Santos-Neto, A. J.; Figueiredo, E. C. Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. **Analyst**, v. 140, n. 22, p. 7768-7775, 2015.

[68] Barbosa, V. M. P.; Barbosa, A. F.; Bettini, J.; Luccas, P. O.; Figueredo, E. C. Direct extraction of lead (II) from untreated human blood serum using restricted access carbon nanotubes and its determination by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 147, p. 478-484, 2016.

[69] Yan, P.; He, M.; Chen, B.; Hu, Bin. Restricted accessed nanoparticles for direct magnetic solid phase extraction of trace metal ions from human fluids followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Analyst**, v. 140, p. 4298-4306, 2015.

[70] Cui, C.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Restricted accessed material-copper (II) ion imprinted polymer solid phase extraction combined with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry for the determination of free Cu (II) in urine and serum samples. **Talanta**, v. 116, p. 1040-1046, 2013.

[71] Dickey, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 35, n.5, p. 227-229, 1949.

[72] Arshady, R.; Mosbach, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 182, n. 2, p. 687-692, 1981.

[73] Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N. A. New method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 7105-7111, 1995.

[74] Saatçılar, Ö.; Şatiroğlu, N.; Say, R.; Bektas, S.; Denizli, A. Binding behavior of Fe<sup>3+</sup> ions on ion-imprinted polymeric beads for analytical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, p. 3520-3528, 2006.

[75] Liu, H.; Kong, D.; Sun, W.; Li, Q.; Zhou, Z.; Ren, Z. Effect of anions on the polymerization and adsorption processes of Cu (II) ion-imprinted polymers. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 348-358, 2016.

[76] Liu, Y.; Qiu, J.; Liu, Z.; Ni, L.; Jiang, Y.; Gong, C.; Meng, X.; Liu, F.; Zhong, G. Tailor-made ion-imprinted polymer based on functionalized graphene oxide for the preconcentration and determination of trace copper in food sample. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 7, p. 1371-1378, 2016.

[77] Walas, S.; Tobiasz, A.; Gawin, M.; Trzewik, B.; Strojny, M.; Mrowiec, H. Application of a metal ion-imprinted polymer based on salen-Cu complex to flow injection preconcentration and F AAS determination of copper. **Talanta**, v. 76, p. 96-101, 2008.

[78] Baghel, A.; Boopathi, M.; Singh, B.; Pandey, P.; Mahato, T. H.; Gutch, P. K.; Sekhar, K. Synthesis and characterization of metal ion imprinted nano-porous polymer for the selective recognition of copper. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 3326-3334, 2007.

- [79] Germiniano, T. O.; Corazza, M. Z.; Segatelli, M. G.; Ribeiro, E. S.; Yabe, M. J. S.; Galunin, E.; Tarley, C. R. T. Synthesis of novel copper ion-selective material based on hierarchically imprinted cross-linked poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate). **Reactive & Functional Polymers**, v. 82, p. 72-80, 2014.
- [80] Kuras, M. J.; Wieckowska, E. Synthesis and characterization of a new copper (II) ion-imprinted polymer. **Polymer Bulletin**, v. 72, p. 3227-3240, 2015.
- [81] Zhang, T.; Yue, X.; Zhang, K.; Li, J.; Zhu, C.; Zhang, L.; Chen, W. Selective adsorption of CuSO<sub>4</sub> from mixed sulfate solutions by Cu (II) ion-imprinted polymers containing salicylaldoximes, ammonium cations, and tertiary amino groups. **Materials and Design**, v. 107, p. 372-377, 2016.
- [82] Ahamed, M. E. H.; Mbianda, X. Y.; Mulaba-Bafubiandi, A. F.; Marjanovic, L. Ion imprinted polymers for the selective extraction of silver (I) ions in aqueous media: Kinetic modeling and isotherm studies. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 474-483, 2013.
- [83] Rajabi, H. R.; Shamsipur, M.; Pourmortazavi, S. M. Preparation of a novel potassium ion imprinted polymeric nanoparticles based on dicyclohexyl 18C6 for selective determination of K<sup>+</sup> ion in different water samples. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 3374-3381, 2013.
- [84] Luo, X.; Guo, B.; Luo, J.; Deng, F.; Zhang, S.; Luo, S.; Crittenden, J. Recovery of lithium from wastewater using development of Li ion-imprinted polymers. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, p. 460-467, 2015.
- [85] Behbahani, M.; Bagheri, A.; Taghizadeh, M.; Salarian, M.; Sadeghi, O.; Adlnasab, L.; Jalali, K. Synthesis and characterisation of nano structure lead (II) ion-imprinted polymer as a new sorbent for selective extraction and preconcentration of ultra trace amounts of lead ions from vegetables, rice, and fish samples. **Food Chemistry**, n. 138, p. 2050-2056, 2013.
- [86] Ebrahimzadeh, H.; Asgharinezhad, A. A.; Moazzen, E.; Amini, M. M.; Sadeghi, O. A magnetic ion-imprinted polymer for lead (II) determination: A study on the adsorption of lead (II) by beverages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 74-80, 2015.
- [87] Shamsipur, M.; Rajabi, H. R.; Pourmortazavi, S. M.; Roushani, M. Ion imprinted polymeric nanoparticles for selective separation and sensitive determination of zinc ions in different matrices. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 24-33, 2014.
- [88] Roushani, M.; Abbasi, S.; Khani, H.; Sahraei, R. Synthesis and application of ion-imprinted polymer nanoparticles for the extraction and preconcentration of zinc ions. **Food Chemistry**, v. 173, p. 266-273, 2015.
- [89] Vatanpour, V.; Madaeni, S. S.; Zinadini, S.; Rajabi, H. R. Development of ion imprinted technique for designing nickel ion selective membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 373, p. 36-42, 2011.

- [90] Abbasi, S.; Roushani, M.; Khani, H.; Sahraei, R.; Mansouri, G. Synthesis and application of ion-imprinted polymer nanoparticles for the determination of nickel ions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 140, p. 534-543, 2015.
- [91] Laatikainen, K.; Udomsap, D.; Siren, H.; Brisset, H.; Sainio, T.; Branger, C. Effect of template ion–ligand complex stoichiometry on selectivity of ion-imprinted polymers. **Talanta**, v. 134, p. 538-545, 2015.
- [92] He, H.; Gan, Q.; Feng, C. Preparation and application of Ni (II) ion-imprinted silica gel polymer for selective separation of Ni (II) from aqueous solution. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 15102-15111, 2017.
- [93] Roushani, M.; Abbasi, S.; Khani, H. Synthesis and application of ion-imprinted polymer nanoparticles for the extraction and preconcentration of mercury in water and food samples employing cold vapor atomic absorption spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 601, p. 1-13, 2015.
- [94] Aboufazeli, F.; Zhad, H. R. L. Z.; Sadeghi, O.; Karimi, M.; Najafi, E.; Novel Cd (II) ion imprinted polymer coated on multiwall carbon nanotubes as a highly selective sorbent for cadmium determination in food samples. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 1, p. 173-178, 2014.
- [95] Lulinski, P.; Kalny, P.; Giebułtowicz, J.; Maciejewska, D.; Wroczynski, P. Synthesis and characterization of cadmium (II)-imprinted poly(1-allyl-2-thiourea-co-ethylene glycol dimethacrylate) particles for selective separation. **Polymer Bulletin**, v. 71, n. 7, p. 1727-1741, 2014.
- [96] Li, M.; Feng, C.; Li, M.; Zeng, Q.; Yang, H. Synthesis and characterization of a surface-grafted Cd (II) ion-imprinted polymer for selective separation of Cd (II) ion from aqueous solution. **Applied Surface Science**, v. 332, p. 463-472, 2015.
- [97] Kang, R.; Qiu, L.; Fang, L.; Yu, R.; Chen, Y.; Lu, X.; Luo, X. A novel magnetic and hydrophilic ion-imprinted polymer as a selective sorbent for the removal of cobalt ions from industrial wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 2268-2277, 2016.
- [98] Tavengwa, N. T.; Cukrowska, E.; Chimuka, L. Sequestration of U(VI) from aqueous solutions using precipitate ion imprinted polymers endowed with oleic acid functionalized magnetite. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 304, p. 933-943, 2015.
- [99] Li, M.; Feng, C.; Li, M.; Zeng, Q.; Gan, Q. Synthesis and application of a surface-grafted in (III) ion-imprinted polymer for selective separation and pre-concentration of indium (III) ion from aqueous solution. **Hydrometallurgy**, v. 154, p. 63-71, 2015.
- [100] Pearson, R. G. Chemical hardness and bond dissociation energies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 23, p. 7684-7690, 1988.

- [101] Cormack, P. A. G.; Elorza A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.
- [102] Singh, D. K., Mishra, S. Synthesis of a new Cu (II)-ion imprinted polymer for solid phase extraction and preconcentration of Cu (II). **Chromatographia**, v. 70, p. 1539-1545, 2009.
- [103] Bojdi, M. K.; Mashhadizadeh, M. H.; Behbahani, M.; Farahani, A.; Davarani, S. S. H.; Bagheri, A. Synthesis, characterization and application of novel lead imprinted polymer nanoparticles as a high selective electrochemical sensor for ultra-trace determination of lead ions in complex matrixes. **Electrochimica Acta**, v. 136, p. 59-65, 2014.
- [104] Martín-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n.7, p. 795-802, 2001.
- [105] Gladis, J. M.; Rao, T. P. Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the preconcentration-separation of traces of uranium. **Microchimica Acta**, v. 146, p. 251-258, 2004.
- [106] Meouche, W.; Laatikainen, K.; Margailan, A.; Silvonon, T.; Siren, H.; Sainio, T.; Beurroies, I.; Denoyel, R.; Branger, C. Effect of porogen solvent on the properties of nickel ion imprinted polymer materials prepared by inverse suspension polymerization. **European Polymer Journal**, v. 87, p. 124-35, 2017.
- [107] Rahman, S. K. A; Yusof, N. A.; Abdullah, A. H.; Mohammad, F.; Idris, A.; Al-lohedan, H. A. Evaluation of porogen factors for the preparation of ion imprinted polymer monoliths used in mercury removal. **Plos One**, v. 4, n. 13, 2018.
- [108] Kala, R.; Biju, V. M.; Rao, T. P. Synthesis, characterization, and analytical applications of erbium (III) ion imprinted polymer particles prepared via  $\gamma$ -irradiation with different functional and crosslinking monomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, p. 51-58, 2005.
- [109] Sousa, M. D.; Barbosa, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1609-1619, 2009.
- [110] Isikver, Y.; Baylav, S. Synthesis and characterization of metal ion-imprinted polymers. **Bulletin of Materials Science**, v. 41, n. 49, p. 1-11, 2018.
- [111] Kempe, M. Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 1948-1953, 1996.
- [112] Machado, F.; Lima, E. L.; Pinto, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.

- [113] Mayes, A. G.; Mosbach, K. Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 21, p. 3769-3774, 1996.
- [114] Mergola, L.; Scorrano, S.; Bloise, E.; Di Bello, M. P.; Catalano, M.; Vasapollo, G.; Del Sole, R. Novel polymeric sorbents based on imprinted Hg(II)-diphenylcarbazone complexes for mercury removal from drinking water. **Polymer Journal**, v. 48, n. 1, p. 73-79, 2015.
- [115] Ao, X.; Guan, H. Preparation of Pb(II) ion-imprinted polymers and their application in selective removal from wastewater. **Adsorption Science & Technology**, v. 36, n. 1-2, p. 774-787, 2017.
- [116] Yu, H.; Shao, P.; Fang, L.; Pei, J.; Ding, L.; Pavlostathis, S. G.; Luo, X. Palladium ion-imprinted polymers with PHEMA polymer brushes: Role of grafting polymerization degree in anti-interference. **Chemical Engineering Journal**, v. 359, p. 176-185, 2019.
- [117] Luo, X.; Yu, H.; Xi, Y.; Fang, L.; Liu, L.; Luo, J. Selective removal Pb(II) ions from wastewater using Pb(II) ion-imprinted polymers with bi-component polymer brushes. **RSC Advances**, v. 7, n. 42, p. 25811-25820, 2017.
- [118] Díaz-García, M. E.; Laíño, R. B. Molecular imprinting in sol-gel materials: recent developments and applications. **Microchimica Acta**, v. 149, p. 19-36, 2005.
- [119] He, H.; Xiao, D.; He, J.; Li, H.; He, H.; Dai, H.; Peng, J. Preparation of a core-shell magnetic ion-imprinted polymer via a sol-gel process for selective extraction of Cu (II) from herbal medicines. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2459-2466, 2014.
- [120] Bali Prasad, B.; Jauhari, D.; Verma, A. A dual-ion imprinted polymer embedded in sol-gel matrix for the ultra trace simultaneous analysis of cadmium and copper. **Talanta**, v. 120, p. 398-407, 2014.
- [121] Zhu, F.; Li, L.; Xing, J. Selective adsorption behavior of Cd (II) ion imprinted polymers synthesized by microwave-assisted inverse emulsion polymerization: Adsorption performance and mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 103-110, 2017.
- [122] Mano, E. B.; Mendez, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2ª ed. Brasil: Edgard Blücher Ltda, 2004.
- [123] Jenkins, A. D.; Jones, R. G.; Moad, G. Terminology for reversible-deactivation radical polymerization previously called "controlled" radical or "living" radical polymerization (IUPAC Recommendations 2010). **Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 483-491, 2010.
- [124] Otsu, T.; Yoshida, M. Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations: polymer design by organic disulfides as iniferters. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 3, n. 2, p. 127-132, 1982.

- [125] Chen, M.; Zhong, M.; Johnson, J. A. Light-Controlled Radical Polymerization: Mechanisms, Methods, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 17, p. 10167-10211, 2016.
- [126] Ran, J.; Wu, L.; Zhang, Z.; Xu, T. Atom transfer radical polymerization (ATRP): A versatile and forceful tool for functional membranes. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 1, p. 124-144, 2014.
- [127] Zhang, H. Controlled/"living" radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 3, p. 579-600, 2013.
- [128] Huang, K.; Chen, Y.; Zhou, F.; Zhao, X.; Liu, J.; Mei, S.; Jing, T. Integrated ion imprinted polymers-paper composites for selective and sensitive detection of Cd (II) ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, p. 137-143, 2017.
- [129] Boos, K. S.; Rudolphi, A.; Vielhauer, S.; Walfort, A.; Lubda, D.; Eisenbeiß, F. Alkyl-Diol Silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, n. 7-8, p. 684-690, 1995.
- [130] Gisch, D. J.; Hunter, B. T.; Feibush, B. Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications**, v. 433, p. 264-268, 1988.
- [131] Cass, Q. B.; Cassiano, N. M. **Cromatografia líquida: Novas tendências e aplicações**. São Paulo: Elsevier, 2015.
- [132] Yoshida, H.; Morita, I.; Tamai, G.; Masujima, T.; Tsuru, T.; Takai, N.; Imai, H. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. **Chromatographia**, v. 19, n. 1, p. 466-472, 1984.
- [133] Menezes, M. L.; Felix, G. On-line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
- [134] Haginaka, J.; Wakai, J.; Yasuda, H. Synthesis of mixed-functional-phase silica supports for liquid chromatography and their applications to assays of drugs in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 535, n. 1-2, p. 163-172, 1990.
- [135] Haginaka, J.; Wakai, J. Preparation and characterization of mixed-functional-phase silica materials using phenyl-, butyl- or octylchlorosilane as a silylating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 596, n. 2, p. 151-156, 1992.
- [136] Suquila, F. A. C.; Oliveira, L. L. G.; Tarley, C. R.T. Restricted access copper imprinted poly(allylthiourea): The role of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the sorptive performance of imprinted polymer. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 714-728, 2018.

- [137] Oliveira L. L. G.; Suquila, F. A. C.; Oliveira, F. M.; Scheel, G. L.; Tarley, C. R. T. Synthesis and application of restricted access material-ion imprinted poly(allylthiourea) for selective separation of Cd<sup>2+</sup> and humic acid exclusion. **Reactive & Functional Polymers**, v. 134, p. 93-103, 2019.
- [138] Đurović, D.; Milisavljević, B.; Nedović-Vuković, M.; Potkonjak, B.; Spasić, S.; Vrvčić, M. Determination of microelements in human milk and infant formula without digestion by ICP-OES. **Acta Chimica Slovenica**, v. 64, n. 2, p. 276-282, 2017.
- [139] Bijl, E.; van Valenberg, H. J. F.; Huppertz, T.; van Hooijdonk, A. C. M. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5455-5464, 2013.
- [140] Verhoeff, J.; Smit, J. A. H. Bovine serum albumin and cell counts in the diagnosis of subclinical udder infection. **Veterinary Quarterly**, v. 3, n. 1, p. 38-45, 1981.
- [141] Poutrel, B.; Caffin, J. P.; Rainard, P. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 3, p. 535-541, 1983.
- [142] Lieske, B.; Jantz, A.; Finke, B. An improved analytical approach for the determination of bovine serum albumin in milk. **Lait**, v. 85, n. 3, p. 237-248, 2005.
- [143] Peters, T. **All About Albumins: Biochemistry, Genetics and Medical Applications**. Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [144] Foster, J. F. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin. In: **Albumin structure, function and uses**, Pergamon Press Inc., p. 53-84, 1977.
- [145] Suturović, Z.; Kravić, S.; Milanović, S.; Đurović, A.; Brezo, T. Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step. **Food Chemistry**, v. 155, p. 120-125, 2014.
- [146] Barreto, R.; Correia, C. R. D.; Muscará, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- [147] Belete, T.; Hussen, A.; Rao, V. M. Determination of concentrations of selected heavy metals in cow's milk: Borena Zone, Ethiopia. **Journal of Health Sciences**, v. 4, p. 105-112, 2014.
- [148] Bizzi, C. A.; Flores, E. L. M.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, J. S. S.; Schmidt, L.; Mortari, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 332-338, 2014.

[149] Marques, T. L.; Wiltsche, H.; Nóbrega, J. A.; Winkler, M.; Knapp, G. Performance evaluation of a high-pressure microwave-assisted flow digestion system for juice and milk sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 18, p. 4449-4458, 2017.

[150] Stürup, S.; Büchert, A. Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 354, n. 3, p. 323-326, 1996.

[151] Nóbrega, J. A.; Gélinas, Y.; Krushevskaya, A.; Barnes, R. M. Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 10, p. 1243-1246, 1997.

[152] Pereira, J. B. J.; Fernandes, K. G.; Müller, R. C. S.; Nóbrega, J. A.; Palheta, D. C. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da Ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333-2335, 2009.

[153] Germiniano, T. O.; Corazza, M. Z.; Segatelli, M. G.; Tarley, C. R. T. Double-imprinted cross-linked poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) as a novel sorbent for the on-line preconcentration and determination of copper (II) by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Letters**, v. 48, p. 61-74, 2014.

[154] Basaglia, A. M.; Corazza, M. Z.; Segatelli, M. G.; Tarley, C. R. T. Synthesis of Pb (II)-imprinted poly(methacrylic acid) polymeric particles loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) for micro-solid phase preconcentration of Pb<sup>2+</sup> on-line coupled to flame atomic absorption spectrometry. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 33001-33011, 2017.

[155] Santos, Q. O.; Bezerra, M. A.; Lima, G. F.; Diniz, K. M.; Segatelli, M. G.; Germiniano, T. O.; Santos, V. S.; Tarley, C. R. T. Synthesis, characterization and application of ion imprinted poly(vinylimidazole) for zinc ion extraction/preconcentration with F AAS determination. **Química Nova**, v. 37, p. 63-68, 2014.

[156] Oliveira, F. M.; Gonçalves Jr, A. C.; Dragunski, D. C.; Segatelli, M. G.; Tarley C. R. T. Application of Ni(II)-imprinted cross-linked poly(methacrylic acid) synthesised through double-imprinting method for the on-line preconcentration of Ni(II) ions in aqueous media. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, p. 1-11, 2014.

[157] Mishra, S.; Verma, N. Surface ion imprinting-mediated carbon nanofiber-grafted highly porous polymeric beads: Synthesis and application towards selective removal of aqueous Pb (II). **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1142-1151, 2017.

[158] Karthik, N.; Sethuraman, M. G. Surface protection of copper by allyl thiourea and hybrid sol-gel coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 90, p. 380-389, 2016.

- [159] Vianna-Soares, C. D.; Kim, C. J.; Borenstein, M. R. Manufacture of porous cross-linked HEMA spheres for size exclusion packing material. **Journal of porous Materials**, v.10, n. 2, p. 123-130, 2003.
- [160] Olsen, E. D. **Métodos ópticos de análisis**. Editorial Reverté, S.A., p. 218. Barcelona-Espanha, 1990.
- [161] Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A. V.; Olivier, J. P.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), **Journal Pure Applied Chemistry**, v. 87, p. 1051-1069, 2015.
- [162] Teixeira, V. G.; Coutinho, F. M. B.; Gomes, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.
- [163] Basta, A. H.; Fierro V.; El-Saied, H.; Celzard, A. 2-Steps KOH activation of rice straw: an efficient method for preparing high-performance activated carbons. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3941-3947, 2009.
- [164] Luz, A. P.; Ribeiro, S.; Pandolfelli, V. C. Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica** [online], v. 54, n. 330, p.174-183, 2008
- [165] Yuan, Y.; Lee, T. R. Ch. 1 Contact angle and wetting properties, in **Contact angle and wetting properties**. Surface Science Techniques, series Springer Series in Surface Sciences, v. 51, p. 3-34. 2013.
- [166] Parameswaran, G.; Mathew, B. Bioremediation of waste water containing hazardous cadmium ion with ion imprinted interpenetrating polymer networks. **Advanced in Environmental Chemistry**, p. 1-10, 2014.
- [167] Babic, B.M.; Milonjic, S.K.; Polovina, M. J.; Kaludierovic, B.V. Point of zero charge and intrinsic equilibrium constants of activated carbon cloth. **Carbon**, v. 37, p. 477-481, 1999.
- [168] Carneiro, C. E. A.; Ivashita, F. F.; Souza, I. G. J.; Souza, C. M. D.; Paesano, A.; Costa, A. C. S.; Di Mauro, E.; Santana, H.; Zaia C. T. B. V.; Zaia D. A. M. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. **International Journal of Astrobiology**, v. 12, n. 2, p. 149-160, 2013.
- [169] Fang, Z.; Guot, T.; Welz, B. Determination of cadmium, lead and copper in water samples by flame atomic-absorption spectrometry with preconcentration by flow-injection on-line sorbent extraction. **Talanta**, v. 38, n. 6, p. 613-619, 1991.
- [170] Segatelli, M. G.; Santos, V. S.; Presotto, A. B. T.; Yoshida, I. V. P.; Tarley, C. R. T. Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole). **Reactive & Functional Polymers**, v. 70, p. 325-333, 2010.

- [171] Tarley, C. R. T.; Barbosa, A. F.; Segatelli, M. G.; Figueiredo, E. C.; Luccas, P. O. Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd (II) determination at ng L<sup>-1</sup> levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, p. 1305-1313, 2006.
- [172] Shahalama, A. B.; Bioussg, A.; Ayouba, G. M.; Acra, A. Competitive adsorption phenomena of petrochemicals – benzene, toluene, and xylene in hexane in fixed-beds of sands. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 95, n. 1-4, p. 221-235, 1997.
- [173] Borba, C. E.; Guirardello, R.; Silva, E. A.; Veit, M. T.; Tavares, C. R. G. Removal of nickel (II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 184-191, 2006.
- [174] Thomas, H. C. Heterogeneous ion exchange in a flowing system. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, n. 10, p. 1664-1666, 1944.
- [175] Long, G. L.; Winefordne, J. D. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, 1983.
- [176] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [177] Zamberlin, Š.; Antunac, N.; Havranek, J.; Samaržija, D. Mineral elements in milk and dairy products. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p.111-125, 2012.
- [178] Gordon, I. Chapter 9: minerals and vitamins in milk and dairy products. In: **Milk and dairy products as functional foods**, John Wiley & Sons Ltd., p. 289-313, 2014.
- [179] Esen, C.; Andac, M.; Bereli, N.; Say, R.; Henden, E.; Denizli, A. Highly selective ion-imprinted particles for solid-phase extraction of Pb<sup>2+</sup> ions. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 18, p. 2464-2470, 2009.
- [180] Abdel-Magid, A.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. studies on direct and indirect reductive amination procedures. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3849-3862, 1996.
- [181] Randall, H. M.; Fowler, R. G.; Fuson, N.; Dangle, R. **Infrared determination of organic structures**, Van Nostrand, New York, 1949.
- [182] Yamaguchi, A.; Penland, R. B.; Mizushima, S.; Lane, T. J.; Curran, C.; Quagliano, J. V. Infrared Absorption Spectra of Inorganic Coördination Complexes. XIV. Infrared Studies of Some Metal Thiourea Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 527-529, 1958.
- [183] Dhumane, N. R.; Hussaini, S. S.; Dongre, V. G.; Karmuse, P. P.; Shirsat, M. D. Growth and characterization of glycine doped bis thiourea cadmium chloride single crystal. **Crystal Research and Technology**, v. 44, n. 5, p. 269-274, 2009.

[184] Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. **Structure determination of organic compounds, tables of spectral data**. 4<sup>th</sup> ed, revised and enlarged edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

[185] Jesen, K. A.; Nielsen, P. H. Infrared spectra of thioamides and selenoamides. **Acta chemica scandinavica**, v. 20, n. 3, p. 597-629, 1966.

[186] Gambino, D.; Kremer E.; Baran, E. J. Infrared spectra of new Re (III) complexes with thiourea derivatives. **Spectrochimica Acta Part A**, v.58, p. 3085-3092, 2002.

[187] Ushasree, P.M.; Muralidharan, R.; Jayavel, R.; Ramasamy, P. Growth of bis(thiourea) cadmium chloride single crystals a potential NLO material of organometallic complex. **Journal of Crystal Growth**, v. 218, p. 365-371, 2000

[188] Chen, G-L.; Lin, H.; Lu, J. H.; Wen, Li.; Zhou, J-Z.; Lin, Z-H. SERS and EQCM studies on the effect of allyl thiourea on copper dissolution and deposition in aqueous sulfuric acid. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, p. 1501-1508, 2008.

[189] Oliveira, F. M.; Somera, B. F.; Ribeiro, E. S.; Segatelli, M. G.; Yabe, M. J.; Galunin, E.; Tarley, C.R.T. Kinetic and isotherm studies of Ni<sup>2+</sup> adsorption on poly(methacrylic acid) synthesized through a hierarchical double-imprinting method using a Ni<sup>2+</sup> ion and cationic surfactant as templates. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 25, p. 8550-8557, 2013.

[190] Walker, P.; Tarn, W. H. **Handbook of Metal Etchants**. CRC Press LLC, p. 355, Florida, 1991

[191] Weast, R. C. **Handbook of Chemistry and Physics. A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data**. CRC Press, p. B-89, Ohio, 1974.

[192] McMenemy, R. H. Albumin binding sites. In: **Albumin structure, function and uses**. Pergamon Press Inc, Oxford, p. 144-147, 1977.

[193] Vendamme, R.; Eevers, W.; Kaneto, M., Minamizaki, Y. Influence of polymer morphology on the capacity of molecularly imprinted resins to release or to retain their template. **Polymer Journal**, v. 41, n. 12, p. 1055-1066, 2009.

[194] Suzhu Y., Fern L. N., Khin C. C. M. Aye A.M., Feng L. N., Yen Y. N. Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 4, p. 2641-2647, 2013.

[195] Mane, S.; Ponrathnam, S.; Chavan, N. Role of interfacial tension of solvating diluents and hydrophilic-hydrophobic cross-linkers in hyper-cross-linked solid supports. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, p. 6893-6901, 2015.

[196] Mane, S. Effect of porogens (type and amount) on polymer porosity: a review. **Canadian Chemical Transactions**, v. 4, n. 2, p. 210-225, 2016.

- [197] Horak, D.; Lednický, F.; Rehak, V.; Svec, F. Porous polyHEMA beads prepared by suspension polymerization in aqueous medium. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 49, p. 2041-2050, 1993.
- [198] Nalawade, A. C.; Ghorpade, R. V.; Shadbar, S.; Qureshi, M. S.; Chavan, N. N.; Khan, A. A.; Ponrathnam, S. Inverse high internal phase emulsion polymerization (i-HIPE) of GMMA, HEMA and GDMA for the preparation of superporous hydrogels as a tissue engineering scaffold. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 450-460, 2016.
- [199] Zdravkov, B. D.; Cermak, J. J.; Sefara, M.; Janku, J. Pore classification in the characterization of porous materials: A perspective. **Central European Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 385-395, 2007.
- [200] He, B.; Patankar, N. A.; Lee, J. Multiple equilibrium droplet shapes and design criterion for rough hydrophobic surfaces. **Langmuir**, v. 19, p. 4999-5003, 2003.
- [201] Yao, C-W.; Alvarado, J. L.; Marsh, C. P.; Jones, B. G.; Collins, M. K. Wetting behavior on hybrid surfaces with hydrophobic and hydrophilic properties. **Applied Surface Science**, v. 290, p. 59-65, 2014.
- [202] Sienkiewicz, A.; Krasucka, P.; Charmas, B.; Stefaniak, W. Swelling effects in cross-linked polymers by thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2017.
- [203] Tran, N. B.; Kim, J. Y.; Kim, Y. C.; Kim, Y. J.; Kim, J. H. CO<sub>2</sub>-responsive swelling behavior and metal-ion adsorption properties in novel histamine-conjugated polyaspartamide hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 16, 2016.
- [204] Tanford, C.; Buzzel, J. G. The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5. **Journal of Physical Chemistry**, v. 60, p. 225-231, 1956.
- [205] Nakamura, K.; Era, S.; Ozaki, Y.; Sogami, M.; Hayash, T.; Murakami, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **FEBS Letters**, v. 417, p. 375-378, 1997.
- [206] Barbosa, L. R. S.; Ortore, M. G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Bernstorff, S.; Itri, R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-Ray scattering study. **Biophysical Journal**, v. 98, p. 147-157, 2010.
- [207] Gomes, R. A. B.; Luccas, P. O.; Magalhães, C. S.; Figueiredo, E. C. Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 16, p. 7407-7414, 2016.
- [208] Mall, I. D.; Srivastava, V. C.; Agarwal, N. K. Removal of orange-g and methyl violet dyes by adsorption onto bagasse fly ash-kinetic study and equilibrium isotherm analyses. **Dyes and Pigments**, v. 69, n. 3, p. 210-223, 2006.

[209] Cuppett, J. D.; Duncan, S. E.; Dietrich, A. M. Evaluation of copper speciation and water quality factors that affect aqueous copper tasting response. *Chemical Senses*, v. 31, p. 689-697, 2006.

[210] Ruiz, G. M. J. Nuevos complejos organometálicos de titanio y circonio en estado de oxidación IV. 1997. 207 fls. Tesis de doutorado (Química) - Universidad de Castilla La Mancha, 1997.

[211] Lechani, N.; Hamdi, M.; Aklil, F.; Khabouche, S.; Baitich, O. B.; Kheffache, Djaffar; Moussi, S.; Ouamerali, O. Complexation of manganese (II), cobalt (II), nickel (II) and copper (II) by a ligand derived from 1,2,4-triazole: potentiometric studies and density functional theory calculations. **European Journal of Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 285-291, 2013.

[212] Bresolin, I. T. L.; Miranda, E. A.; Bueno, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Químia Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009

[213] He, S.; Huang, M.; Ye, W.; Chen, D.; He, S.; Ding, L.; Yao, Y.; Wan, L.; Xu, J.; Miao, S. Conformational change of bovine serum albumin molecules at neutral pH in ultra-diluted aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 42, p. 12207–12214, 2014

[214] Kozlevcar, B.; Segedin, P. Structural analysis of a series of copper (II) coordination compounds and correlation with their magnetic properties. **Croatica Chemica Acta**, v. 81, n. 2, p. 369-379, 2008.

[215] Melzer, M. M.; Mossin, S.; Cardenas, A. J. P.; Williams, K. D.; Zhang, S.; Meyer K.; Warren, T. H. A. Copper (II) thiolate from reductive cleavage of an S-Nitrosothiol. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 8658-8660, 2012.

[216] Woertink, J. S.; Tian, L.; Maiti, D.; Lucas, H. R.; Himes, R. A.; Karlin, K. D.; Neese, F.; Würtele, C.; Holthausen, M.; Bill, E.; Sundermeyer, J.; Schindler, S.; Solomon, E. I. Spectroscopic and computational studies of an end-on bound superoxo-Cu(II) complex: geometric and electronic factors that determine the ground state. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 9450-9459, 2010.

[217] Li, S-H.; Wang, J.; Zhao, M-P. Cupric ion enhanced molecular imprinting of bovine serum albumin in hydrogel. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3359-3363, 2009.

[218] Gonzalez, F. L. F.; Levi, V. Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, n. 5, p. 319-322, 2003.

[219] Elci, A.; Kabakçı, E.; Elci, L. Solid-phase extractive preconcentration of trace copper as its calmagite anionic chelate using a polyaniline column for flame atomic absorption spectrometric determination. **Analytical Letters**, v. 48, n. 4, p. 632-646, 2014.

[220] Turan, K.; Saygili Canlıdınç, R.; Kalfa, O. M. Selective preconcentration of trace amounts of Cu (II) with surface-imprinted multiwalled carbon nanotubes. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 46, n. 1, p. 1-10, 2017.

[221] Javed, H.; Islam, A.; Chauhan, A.; Kumar, S.; Kumar, S. Efficacy of engineered GO Amberlite XAD-16 picolylamine sorbent for the trace determination of Pb (II) and Cu (II) in fishes by solid phase extraction column coupled with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Scientific Reports**, v. 8, n. 17560, p. 1-11. (2018).

[222] Baytak, S.; Channa, A. M.; Çamuroğlu, E. *Mucor pusillus* immobilized Amberlite XAD-4 biocomposites for preconcentration of heavy metal ions by solid-phase extraction method. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2018.

[223] Elvan, H.; Ozdes, D.; Duran, C.; Sahin, D.; Tufekci, M.; Bahadir, Z. Separation and preconcentration of copper in environmental samples on Amberlite XAD-8 resin after complexation with a carbothioamide derivative. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 831-835, 2013.

[224] Pourjavid, M. R.; Hosseini, M. H.; Rezaee, M.; Ashouri M. Investigation of adsorption mechanism of Fe, Cu, and Zn ions in extraction and preconcentration process on synthesized graphene oxide using an indole derivative. **Structural Chemistry**, v. 29, p. 615–624, 2018.

[225] Vellaichamy, S. Adsorptive separation of copper, nickel, lead, zinc and cadmium from aqueous solution using MWCNTs impregnated with D2EHPA and prior to their determination by F AAS: Kinetic and equilibrium studies. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 644-656, 2017.

[226] Mohammadi, S. Z.; Afzali, D.; Sabermahani, F.; Afshari, S. Preconcentration of copper from natural water samples using ligand-less in situ surfactant-based solid phase extraction prior to F AAS determination. **Química Nova**, v. 37, p. 1436-1440, 2014.

[227] Khayatian, G.; Moradi, M.; Hassanpoor, S. MnO<sub>2</sub>/3MgO nanocomposite for preconcentration and determination of trace copper and lead in food and water by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 73, p. 470-478, 2018.

[228] Habila, M. A.; Alothman, Z. A.; Yilmaz, E.; Soylak, M. Activated carbon cloth filled pipette tip for solid phase extraction of nickel(II), lead(II), cadmium(II), copper(II) and cobalt(II) as 1,3,4-thiadiazole-2,5-dithiol chelates for ultra-trace detection by F AAS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 2-11, 2018.

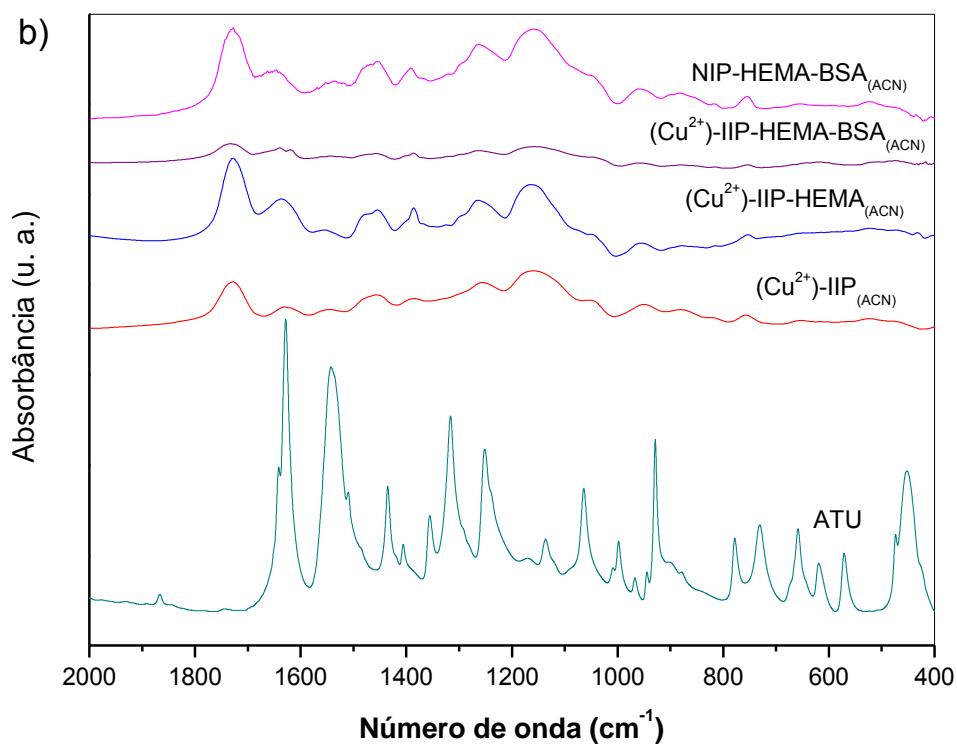
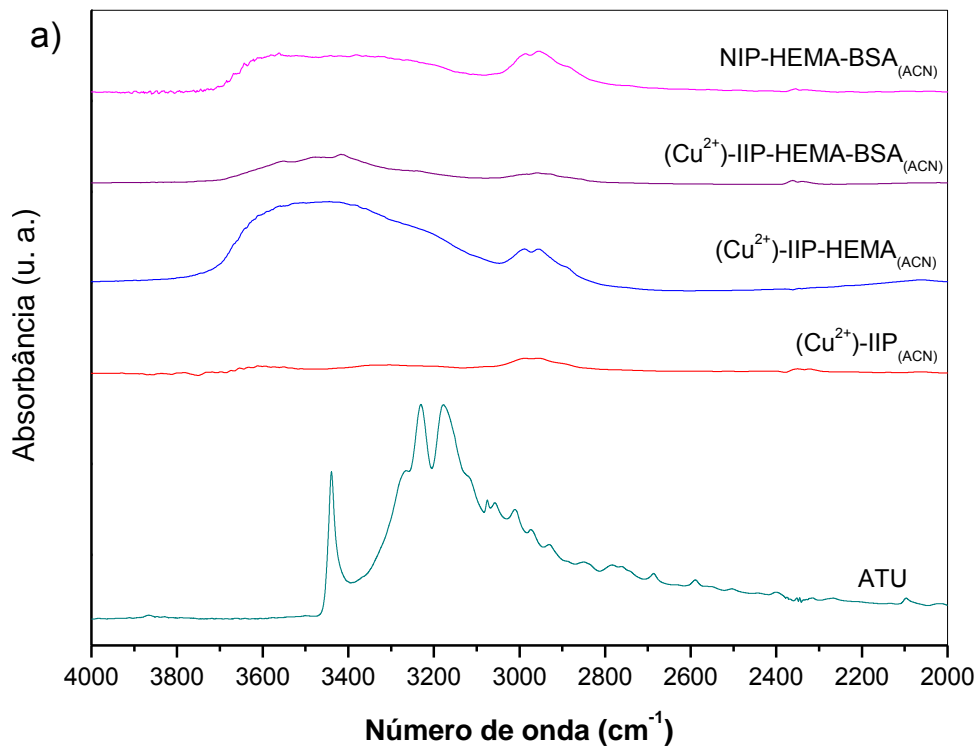
[229] Atkins, P. W.; Jones, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**, 5ª ed., Bookman, New York, 2011.

[230] Carr, C. W. Studies on the binding of small ions in rotein solutions with the use of membrane electrodes. II. The binding of calcium ions in solutions of bovine serum albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 43, p. 147-156, 1953.

**ANEXOS**

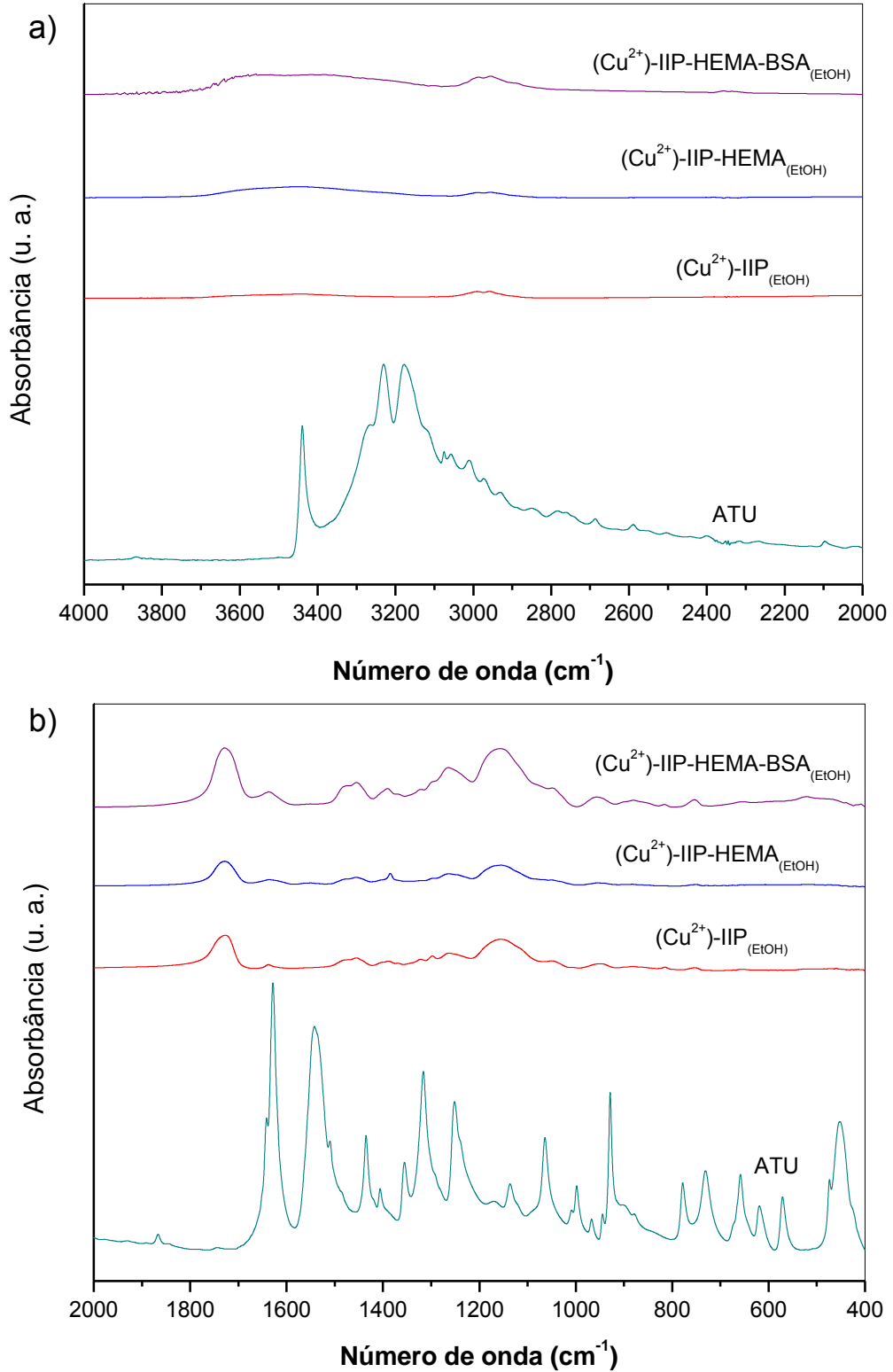
## ANEXO A

Espectros de absorvância no FT-IR da ATU pura e dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}$  e NIP-HEMA-BSA sintetizados em acetonitrila (ACN). Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ): (a) de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  e (b) 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .



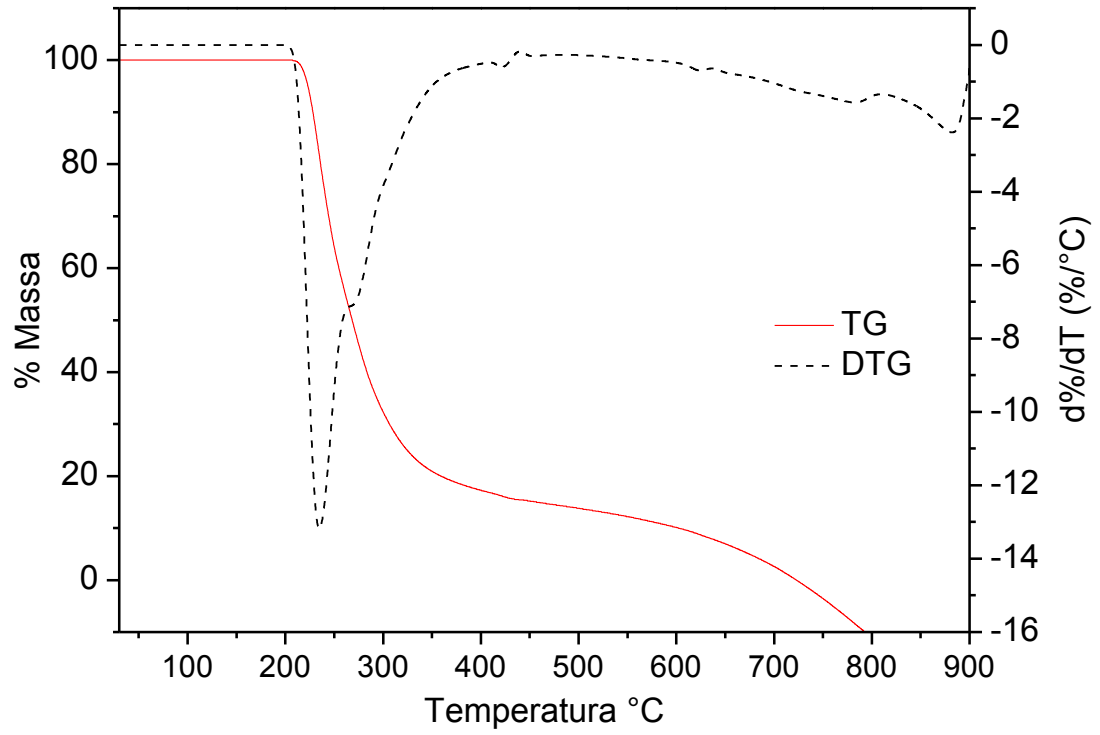
## ANEXO B

Espectros de absorbância no FT-IR da ATU pura e dos polímeros  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP}$ ,  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA}$  e  $(\text{Cu}^{2+})\text{-IIP-HEMA-BSA}$  sintetizados em etanol (EtOH). Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ): (a) de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  e (b) 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .



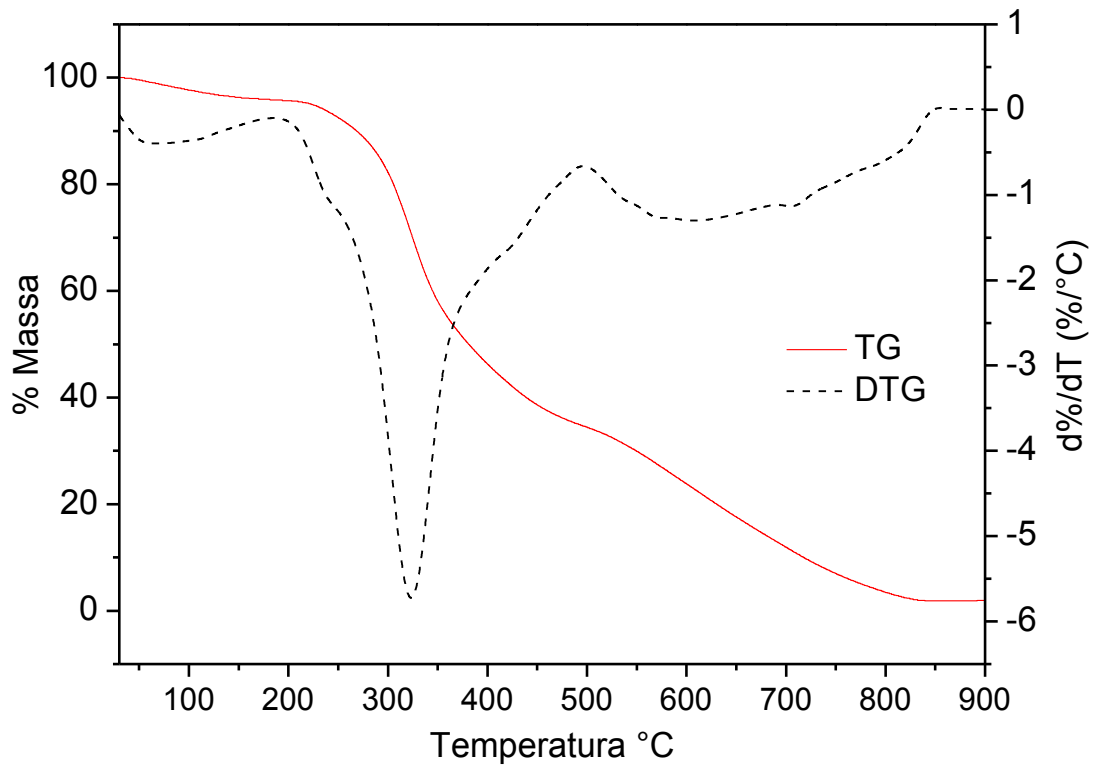
**ANEXO C**

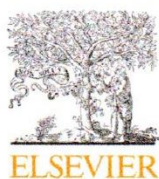
Curva TG e derivada DTG da ATU pura.



**ANEXO D**

Curva TG e derivada DTG da proteína BSA em pó.





Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cej](http://www.elsevier.com/locate/cej)

## Restricted access copper imprinted poly(allylthiourea): The role of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the sorptive performance of imprinted polymer

Fabio A.C. Suquila<sup>a</sup>, Leandro L.G. de Oliveira<sup>a</sup>, César R.T. Tarley<sup>a,b,\*</sup>

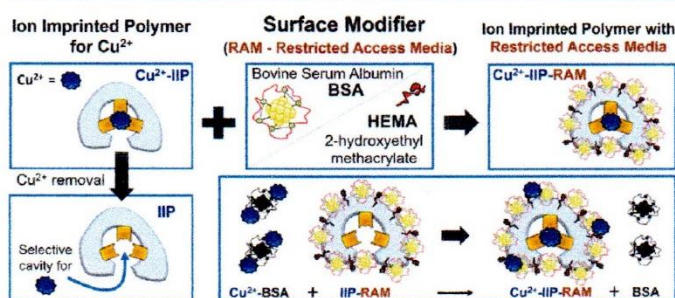
<sup>a</sup> Department of Chemistry, State University of Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, CEP: 86050-482 Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> National Institute of Science and Technology in Bioanalysis (INCTBio), State University of Campinas (UNICAMP), Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n, CEP: 13083-861 Campinas, SP, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Ionic imprinted polymers for  $\text{Cu}^{2+}$  with and without restricted access were synthesized.
- Surface modifiers influence on the  $\text{Cu}^{2+}$  sorption selective was assessed.
- Polymers synthesized in ACN showed higher porosity than the ones synthesized in EtOH.
- The IIP-HEMA-BSA excludes macromolecules and preconcentrates  $\text{Cu}^{2+}$  simultaneously.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Copper  
IIP-RAM  
Hydrophilic co-monomer  
Restricted access material  
Characterization  
Flame atomic absorption spectrometry

### ABSTRACT

In this study, imprinted polymers based on copper imprinted poly(allylthiourea) synthesized in acetonitrile (ACN) ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(ACN)</sub> or ethanol (EtOH) ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(EtOH)</sub> and the effect of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the surface of polymers towards simultaneous preconcentration of  $\text{Cu}^{2+}$  and macromolecule exclusion was assessed. Characterization of polymers was carried out by means of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), thermogravimetric analysis (TGA), textural data [surface area ( $S_{\text{BET}}$ ), total pore volume ( $V_{\text{T}}$ ) and average pore diameter ( $D_{\text{p}}$ )], swelling analysis, wettability measurement and determination of point zero charge (PZC). It was noticed that ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(ACN)</sub> showed higher porosity than the one ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(EtOH)</sub>. From the competitive sorption, relative selectivity coefficient ( $k'$ ) higher than one unit was obtained by comparing ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(ACN)</sub> with non-imprinted polymer [NIP<sub>(ACN)</sub>] over a range of foreign metal ions with same charge and similar ionic radius, thus confirming the imprinting effect created during polymer synthesis. It was also found that the hydrophilic co-monomer (HEMA) as well as the larger molecule BSA coating on ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(ACN)</sub> decreases accentually the selectivity of sorbent. On the other hand, the sorbent ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> demonstrated great capability in promoting simultaneously the sorption of  $\text{Cu}^{2+}$  and exclusion of BSA in solution at pH 4.50, thus showing potential application perspectives for the development of matrix interference-free enrichment method towards  $\text{Cu}^{2+}$  determination in complicated matrices, such as biological fluids and food samples without implementing common sample treatments based on acid digestion.

\* Corresponding author at: Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, CEP: 86050-482 Londrina, PR, Brazil.  
E-mail address: [tarley@uel.br](mailto:tarley@uel.br) (C.R.T. Tarley).

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.176>

Received 26 March 2018; Received in revised form 26 May 2018; Accepted 29 May 2018

Available online 30 May 2018

1385-8947/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Since molecularly imprinted polymers (MIP) and ion imprinted polymers (IIP) were developed by Wulff and Sarhan [1] and Nishide and coworkers [2], they have been widely employed in the separation techniques (chromatography, capillary electrochromatography, solid phase extraction), binding assays and sensors [3,4].

The high selectivity of such materials based on molecular imprinting technology is result of creation of tailor-made binding sites with memory of size and shape, which in turn are formed by means of interaction of functional monomers and template (molecule or ion) in the presence of cross-linker reagent [5–7].

Although molecular imprinting technology has been well-known in the understanding the complementary concept for biological recognition based on lock-and-key mechanism, which has been attested by a number of publications [8,9], there exist some drawbacks in using imprinted polymers in complicated matrices such as biological fluids and food samples without interference [10]. Such drawbacks leads to significant decrease on selective performance of imprinted polymers due to sorption of macromolecules (proteins, carbohydrates, nucleic acids, etc.) on their surfaces, thus obstructing the tailor-made binding sites and, as consequence, making undesired loss on adsorption capacity and selectivity. For this reason, if one considers the application of IIP for trace metal ions enrichment, up to now, the majority studies report the need for previous acid digestion procedures to make a reliable interference-free analysis [11,12].

In the case of MIP, in order to obtain this material able to work in complex matrices, recent researches have been successfully devoted to overcome these problems by exploiting new synthesis approaches based on combination of molecular imprinting technology and restricted access material (RAM) to obtain in a single sorbent the so-called MIP-RAM [13].

Restricted access-based materials are sorbents containing on their external surface hydrophilic functional groups and/or proteins capable of excluding macromolecules through a physical diffusion barrier, based on the size of the pore, or by a chemical diffusion barrier, where the low weight molecules (analytes) can permeate into the inner surface of RAMs and be retained, or a combination of physical-chemical barriers [14–16]. Additionally, the insertion of hydrophilic monomers such as 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) or protein such as bovine serum albumin (BSA) on the surface of imprinted polymers also provides better performance towards application in aqueous medium, since these compounds are known to allow water compatibility [17,18].

As can be observed, due to characteristics of both materials (MIP and RAM), the restricted access imprinted polymer-based materials are considered outstanding sorbents capable to selectively retain the target analyte (template) and simultaneously avoid attachment of macromolecules on their surface, as well as prevent the water interference, since water molecules can significantly decrease the selectivity of MIP as result of non-specific interactions with recognition binding sites [19].

A briefly survey of literature demonstrates that the most common approaches to obtain MIP-RAM are based on polymer surface modification by using the hydrophilic co-monomers together or not with BSA or hydrophilic co-monomers obtained after chemical treatment together or not with BSA [19].

In the pioneer study carried out by Haginaka and co-authors in 1999 [13], the authors synthesized a MIP-RAM with a layer of hydrophilic co-monomers (GMA – glycerol monomethacrylate and GDMA – glycerol dimethacrylate), which presented a satisfactory exclusion of macromolecules and high selectivity, that could be applicable to direct serum injection assays of (S)-naproxen. Similarly, others researchers [20–24] obtained MIP-RAMs with high relative selectively coefficient and satisfactory macromolecules exclusion aiming at sorption paracetamol, chlorpromazine, caffeine, propranolol and 2-methoxyestradiol in aqueous medium and biological fluids. Recently our research group proposed the synthesis of an organic/inorganic hybrid MIP-RAM [poly

(methacrylic acid- trimethylolpropane trimethacrylate)/SiO<sub>2</sub>] exploiting random free-radical polymerization and sol-gel process to be used as sorbent for folic acid extraction from milk samples [25]. In this study, vinyltrimethoxysilane (VTMS) was used as coupling agent between organic and inorganic phases, tetraethoxysilane (TEOS) was used as inorganic monomer and (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane was used as modifier agent with posterior opening of epoxy ring to impart hydrophilic properties of material in the extraction of folic acid.

In another study, Santos and co-workers [26] synthesized MIP-RAMs to be used in the determination of  $\beta$ -blockers in urine samples using methacrylic acid as functional monomer; GDMA and HEMA as hydrophilic co-monomers and BSA attached on the surface of polymer. The authors concluded that the synthesis procedure influences the size and shape of particles and that hydrophilic co-monomer addition as well as coating with BSA do not alter the chemical recognition ability of the material.

As it can be seen based on previous publications, although few studies have been still developed, the state-of-the-art in understanding the influence of hydrophilic co-monomer and BSA on the selective sorption of target molecule and macromolecule exclusion has been at-tested. On the other hand, in what concerns IIP, studies devoted on influence of surface modification with hydrophilic co-monomer and BSA on the selective sorption of metal ion (analyte target) and macromolecule exclusion have not yet been reported in literature. The only IIP-RAM synthesized was reported by Cui and co-workers [27], who prepared a sorbent using methacrylic acid as monomer with selectivity for Cu<sup>2+</sup> and anti-interference ability of macromolecules in human urine and serum samples, which clearly indicates that studies on this subject are still incipient. Furthermore, in such study, none hydrophilic co-monomer or BSA was used as modifiers element to support the idea of restricted access imprinted polymer-based materials.

Thus, according to aforementioned, the main aim of the present study was to synthesize, for the first time, IIPs for copper sorption using 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) as restricted access materials. The influence of porogenic solvent ACN and EtOH on the copper sorption and porosity was also evaluated. Due to the high affinity between sulfur atoms from thiolates and Cu<sup>2+</sup> ions [28,29], allylthiourea (ATU) was herein used as functional monomer for obtaining copper imprinted poly(allylthiourea). The influence of HEMA and BSA on the selective copper sorption by IIP macromolecule exclusion (BSA) was evaluated in details and the different sorbent materials were characterized by FT-IR, SEM, EDS, TGA and N<sub>2</sub> physisorption to obtain textural data [surface area (S<sub>BET</sub>), total pore volume (V<sub>T</sub>) and average pore diameter (D<sub>p</sub>)]. In addition, methodologies of swelling analysis, wettability and point of zero charge (PZC) were also applied to characterize the polymers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All reagents used in this study were of analytical-grade. For the polymers synthesis, the following reagents were used: copper(II) nitrate trihydrate (98–103%), allylthiourea (ATU, 98%), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, 98%), 2,2'-azobis-iso-butyronitrile (AIBN, 98%), bovine serum albumin (BSA, 98%), glutaraldehyde (25% in water), sodium borohydride (98%), acetonitrile (ACN, 99%), which were acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA, 98%) from Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA); ethyl alcohol (EtOH, Synth, Diadema, SP, BR, 99%). Cu<sup>2+</sup> working solution of 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  was prepared from 1000 mg L<sup>-1</sup> stock solution of Cu<sup>2+</sup> from the Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O in 5% (v/v) HCl by making appropriate dissolution. Stock solutions of Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> of 1000 mg L<sup>-1</sup> concentration for selectivity studies were prepared from salts of cadmium nitrate tetrahydrate (99%), cobalt(II) nitrate hexahydrate (98–102%), lead nitrate (99%),

zinc nitrate hexahydrate (98%) from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, BR) and iron (II) chloride (98%), nickel(II) nitrate hexahydrate (99%) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), respectively, by making appropriate dilutions immediately prior to the use. Acetate, phosphate, Tris-HCl and ammonia buffer solutions were prepared from salts of sodium acetate (Vetec, 99%), sodium dihydrogen phosphate monohydrate (J.T. Baker, Ecatepec, State of Mexico, Mexico, 98%), tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany) and ammonium chloride (J.T. Baker, 100%), respectively, without further purification. The desired pH of solutions was adjusted with sodium hydroxide (Vetec, 99%) and/or hydrochloric acid (Panreac, Darmstadt, Germany, 37%) solutions. The eluent solution was prepared by dilution of concentrated hydrochloric acid. Ultrapure water from an ELGA PURELAB Maxima purification system (High Wycombe, Bucks, UK.) with 18.2 MΩ cm was used to prepare all the solutions. To prevent any risk of metal contamination, all the plastic and glassware were kept in a 10% (v/v) HNO<sub>3</sub> solution for 24 h and then washed with deionized water prior to use.

## 2.2. Syntheses of polymers

Polymers were prepared by bulk polymerization technique. Firstly, for (Cu<sup>2+</sup>)-IIP synthesis 0.5 mmol (0.1208 g) of Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (template ion) were dissolved in 10.0 mL of ACN. Then, 5.0 mmol (0.5927 g) of ATU (bifunctional monomer) previously dissolved in 5.0 mL of ACN were added. The mixture was stirred for 5.0 min. In the next step, 20.0 mmol (3.8 mL) of EGDMA (cross-linker) and 0.6 mmol (0.1020 g) of AIBN (free-radical initiator) were added to the mixture. The mixture was bubbled with nitrogen gas for 5.0 min, then the flask was sealed and the polymerization occurred at 60 °C in an oil bath for 24 h. Upon this time, the polymer obtained was dried, crushed, grounded in a mortar and sieved to obtain particles size of 106–150 μm.

The synthesis of (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> was performed in similar way to (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(ACN)</sub>; however, 5.0 mmol (600.0 μL) of HEMA (hydrophilic co-monomer) were added together with the other reagents in a single step [20]. Then, a portion of (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> was used to the BSA immobilization on its surface, according to procedure described by Moraes et al. [21]. For this step, a 20.0 mL 1% (m/v) BSA solution prepared in 50.0 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 6.00) was percolated through a mini-column containing 500.0 mg of (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> at 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Next, 5.0 mL of 25% (m/v) glutaraldehyde aqueous solution were percolated at 1.0 mL min<sup>-1</sup> and the system was maintained in standby during 5 h. Upon this time, 10.0 mL of 1% (m/v) sodium borohydride aqueous solution was percolated through the mini-column at 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Finally, (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> was exhaustively washed with ultrapure water. In this study, some characterization studies were performed with and without Cu<sup>2+</sup> removal from the polymer matrix. Thus, the polymers submitted to Cu<sup>2+</sup> removal were named IIP, IIP-HEMA and IIP-HEMA-BSA.

In order to evaluate the influence of porogenic solvent on the morphological and textural features of the polymers, as well as the influence of these properties on the Cu<sup>2+</sup> preconcentration process and BSA exclusion, the same aforementioned polymers were also synthesized in EtOH, as porogenic solvent, and named as (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(EtOH)</sub>, (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub>, and (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>.

Finally, non-imprinted polymers, NIP<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> material were also synthesized. However, only the NIP<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> polymers were used for selectivity study in this work. The schematic diagram depicted in Fig. 1 shows the synthesis of (Cu<sup>2+</sup>)-IIP<sub>(ACN)</sub>, (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and (Cu<sup>2+</sup>)-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> polymers.

## 2.3. Instrumentation for characterization

The identification of functional groups in the polymers was carried out by using a Shimadzu FT-IR-8300 Fourier transform spectrometer

operating in transmission mode (4000–400 cm<sup>-1</sup>), at standard KBr pellet method, while the surface morphological features were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), using a microscope Philips FEI Quanta 200 (Amsterdam, The Netherlands) equipped with energy dispersive X-ray spectroscopy system (EDS). For SEM analysis, the polymers were coated with a thin layer of gold (30 nm) using Bal-Tec SCD Sputter Coater equipment (New York, USA), in order to minimize charging under the incident electron beam. The SEM images of the polymers were obtained in 70, 2000, 10000 and 30000 times magnified with a range of 1.0 mm, 50.0 μm, 10.0 μm and 2.0 μm, respectively. Energy dispersive X-ray analysis (EDS) was used to provide semi-quantitative elemental composition information of copper (Cu), sulfur (S), carbon (C) and oxygen (O) atoms present in the polymers. Elemental analysis was performed using PerkinElmer 2400 series-II CHNS/O analyzer using L-cystine as reference standard. The textural characterization of polymers was carried out by N<sub>2</sub> gas adsorption-desorption isotherms at 77 K (−196 °C) in the range of relative pressures from ~10<sup>-6</sup> to 0.995 mmHg using a Quantachrome Nova 1200e automatic instrument coupled to an automatic gas analyzer (Quantachrome, Boynton Beach, FL, USA). For this analysis, 250.0 mg of sample were introduced on a glass sampling tube of 9 mm with a bulb. Prior to adsorption measurements, the samples were degassed by heating for 4 h at 120 °C under vacuum in the port of the adsorption analyzer. Then, a glass rod was inserted inside the glass sampling tube to reduce its total volume and the tube was placed in the BET analysis instrument. The glass sampling tube containing the sample was immersed in liquid nitrogen bath at 77 K during the nitrogen adsorption tests. All specific measurements are calculated from final weights of samples. About 39 points was usually obtained on the two branches of the isotherm. From nitrogen adsorption-desorption isotherms, surface area (S<sub>BET</sub>), total pore volume (V<sub>T</sub>) and average pore diameter (D<sub>p</sub>) were calculated. The S<sub>BET</sub> was determined according to the Brunauer–Emmett–Teller (BET) equation, which incorporates multilayer coverage. The generalized BET equation in the linear function for gas adsorption can be described as follows [30]:

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{v \left[ 1 - \left( \frac{p}{p_0} \right) \right]} = \frac{c-1}{v_m c} \left( \frac{p}{p_0} \right) + \frac{1}{v_m c} \quad (1)$$

where  $v$  is the adsorbed volume of gas,  $v_m$  is the adsorbed monolayer volume,  $p$  is the equilibrium gas pressure,  $p_0$  is the saturation pressure and  $C$  is the BET constant.

The slope  $[(c-1)/v_m c]$  and y-intercept  $(1/v_m c)$  of linear region from adsorption isotherm give the monolayer capacity,  $v_m$ , which is used to calculate BET surface area (S<sub>BET</sub>) by the equation:

$$S_{BET} = \frac{v_m N_{AV} \sigma}{v_0 m} \quad (2)$$

The constant  $N_{AV}$  is Avogadro's number,  $\sigma$  is the cross-sectional surface area of a single adsorbed gas molecule (16.2 Å<sup>2</sup> for nitrogen),  $m$  is the mass of polymer used in the measurement and  $v_0$  is 22.40 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>, which represents standard temperature and pressure (STP) volume of one mole of gas. S<sub>BET</sub> is given in units of area/mass (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). Total pore volume (V<sub>T</sub>) and average pore diameter (D<sub>p</sub>) of the polymers were estimated by the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method, which is based on the Kelvin equation of pore filling and corrected for multilayer adsorption, widely used for calculations of pore size distribution (PSD) over the mesopore and small macropore size range. V<sub>T</sub> is derived from the amount of vapor adsorbed at relative temperature of  $p/p_0 = 0.99$  (assuming pores are filled with liquid adsorbate) as follows [31]:

$$V_T = \frac{p_a v_m v_{N_2}}{RT} \quad (3)$$

where V<sub>T</sub> is the volume of liquid N<sub>2</sub> in pores,  $p_a$  is the ambient pressure,  $v_m$  is the volume of gas adsorbed,  $v_{N_2}$  is the molar volume of liquid

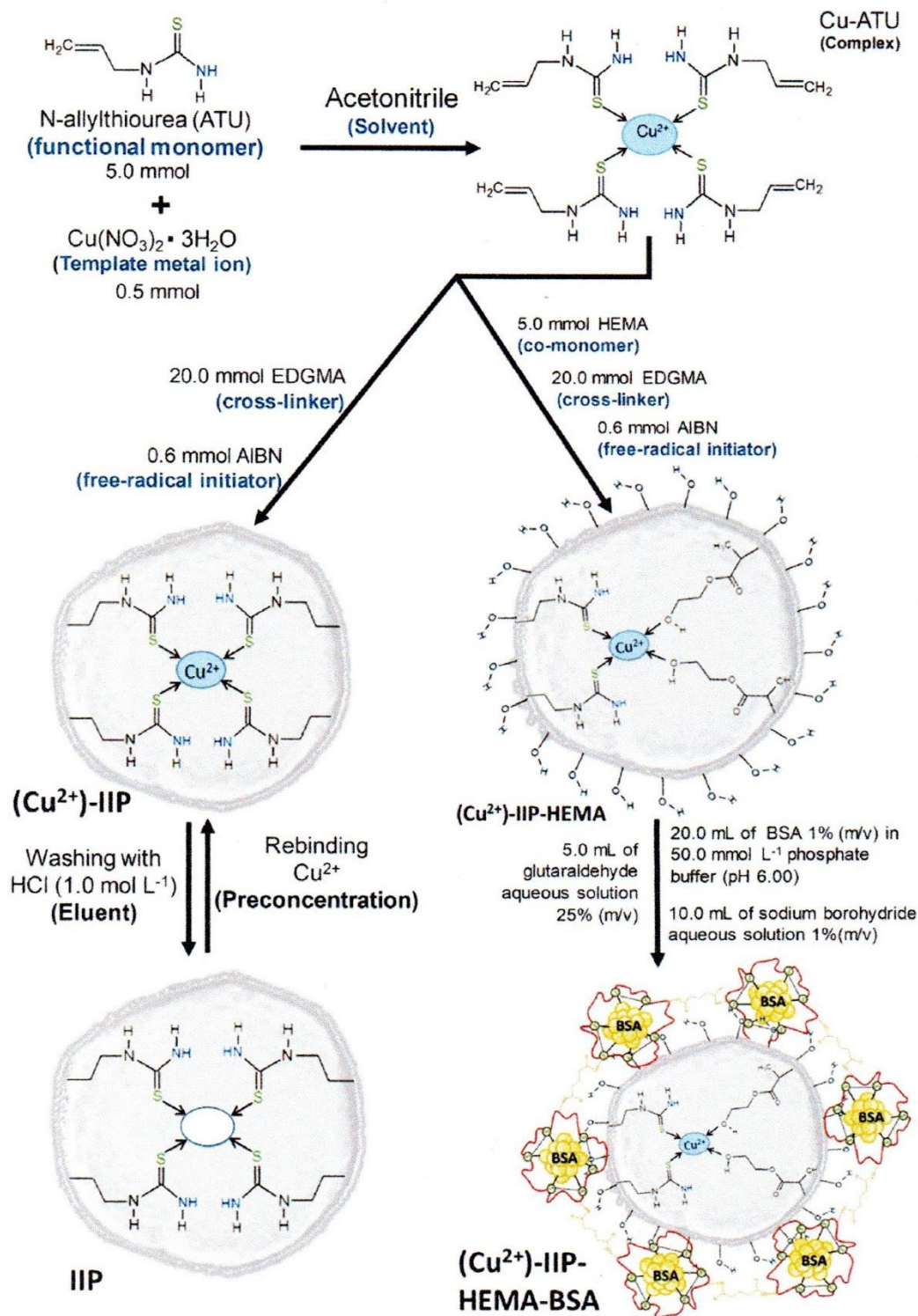


Fig. 1. Schematic illustration of the synthesis steps for ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP<sub>(ACN)</sub>, ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and ( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> polymers.

adsorbate ( $N_2 = 34.7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ),  $R$  is the ideal gas constant ( $8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) and  $T$  is the ambient temperature (K).  $D_p$  was calculated using the relation expressed as:

$$D_p = \frac{4V_T}{S_{BET}} \quad (4)$$

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on a TGA 4000 (PerkinElmer, Massachusetts, USA) to determine the thermal stability of

the materials in the temperature range of 30–900 °C (heating rate  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , nitrogen flow rate  $20 \text{ mL min}^{-1}$ ). The pH of the samples and working solutions were measured with a Metrohm 826 mobile digital pH meter (Herisau, Switzerland).

#### 2.4. Wettability measurement

Wettability properties of the polymers were investigated by the

sessile drop (SD) method [32,33]. 30.0 mg of the polymers were uniaxially compacted in circular discs of 13 mm in diameter, using an evacuable KBr & briquetting pellet dies and a manual press (Schulz Joinville, SC-BR), applying a force of 2 tons for 30 s. Then, with a microsyringe, a water droplet (1.3  $\mu\text{L}$ ) was deposited onto the surface of the polymer. The images were captured on the transverse plane with a common 13-megapixel camera placed on the portable metal tripod.

### 2.5. Swelling analysis

The swelling characteristics of polymers were determined in order to check hydrophilic affinity by the water uptake, as a complementary study of wettability [17,34]. 100.0 mg of each polymer ( $M_D$ : Dry Mass) were mechanically stirred with 10.0 mL of ultrapure water (pH 6.80) for 24 h, and then the materials were filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon (Magna) membrane under vacuum and weighed ( $M_S$ : Swollen Mass). The initial ( $M_D$ ) and final ( $M_S$ ) masses of polymers were used to calculate the swelling ratio (SR%) determined by the following equation (5):

$$SR(\%) = \frac{(M_S - M_D)}{M_D} \times 100 \quad (5)$$

### 2.6. Point of zero charge (PZC)

The point of zero charge (PZC), i.e. the value of pH ( $\text{pH}_{\text{PZC}}$ ) at which the net charge on the sorbent is zero, was determined by batch procedure at room temperature. 50.0 mg of each polymer were weighted and added separately in a falcon conical tube (50.0 mL) and shaken with 25.0 mL of a 0.10  $\text{mol L}^{-1}$  KCl solution at different pH values adjusted with HCl and NaOH (0.10  $\text{mol L}^{-1}$ ), varying from 3.00 up to 13.00, for 24 h. Upon this time, the pH was measured again. The amount of  $\text{H}^+$  or  $\text{HO}^-$  ions adsorbed by the polymers was calculated from the difference between the initial and the final concentration of  $\text{H}^+$  or  $\text{HO}^-$  ions [35,36].

### 2.7. Rebinding measurements using flow injection analysis

AA-7000 Shimadzu (Kyoto, Japan) flame atomic absorption spectrometer equipped with a copper hollow cathode lamp as radiation source (Hamamatsu Photonics, K.K) and deuterium background corrector was used for determination of  $\text{Cu}^{2+}$  ion during its removal from polymer and also during the recognition of copper. The hollow cathode lamp was operated at 8.0 mA and the wavelength was set at 324.8 nm using spectral bandwidth of 0.5 nm. All measurements were carried out in an acetylene/air flame at 1.8 and 15.0  $\text{L min}^{-1}$ , respectively.

Flow injection analysis (FIA) system coupled with flame atomic absorption spectrometry (FAAS) (FIA-FAAS) detection was configured in two steps as shown in Fig. 2. The flow injection system is consisted of a GILSON Minipuls Evolution peristaltic pump (Middleton, WI, USA) and Tygon tubing for propelling samples and eluent in the detection system. Preconcentration was carried out using 50.0 mg of each polymer in the absence of  $\text{Cu}^{2+}$  packed separately into a homemade cylindrical mini-columns, made of sections of polyethylene eppendorf pipette tips (1.5 cm in length with an internal diameter of 5.0 mm) with each of the extremities sealed by a small piece of cotton tissue as filter material to avoid any removal of the polymer by the carrier stream [37]. The mini-columns were coupled alternately in a homemade commutator injector made in poly(acrylic acid) for preconcentration and elution step. All connecting tubes consist of polyethylene (0.8 mm internal diameter) and the elution step was carried out in counter-current. Fig. 2(A) and (B) depict the preconcentration step and elution step, respectively.

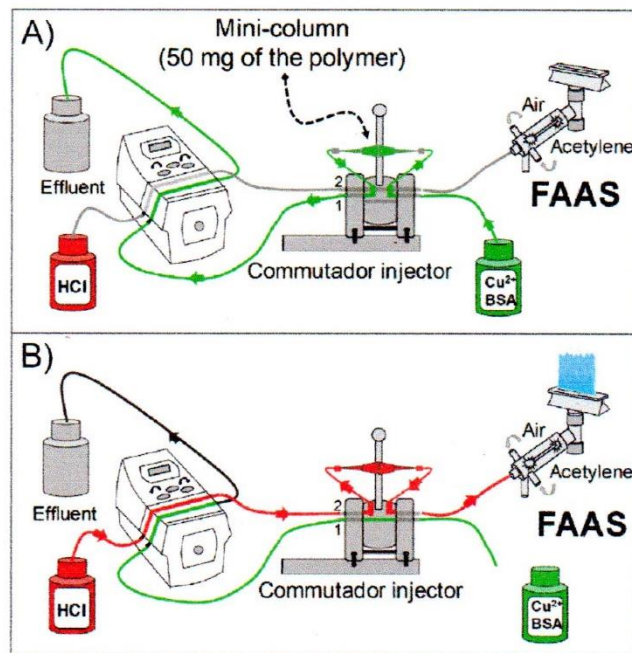


Fig. 2. Scheme of the flow injection preconcentration/elution system. A) preconcentration step – mini-column position in line 1. B) elution step – mini-column position in line 2. Eluent: HCl 1.00  $\text{mol L}^{-1}$ , mass of polymer: 50.0 mg, sample loop 20.0 mL, flow rate preconcentration/elution: 5.0  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 2.8. Influence of pH on $\text{Cu}^{2+}$ sorption

The influence of pH on  $\text{Cu}^{2+}$  sorption by  $\text{IIP}_{(\text{EtOH}, \text{ACN})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{EtOH}, \text{ACN})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{EtOH}, \text{ACN})}$  and  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  was studied by the sorption of  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solution using FIA-FAAS previously described. In the first step [Fig. 2(A)], 20.0 mL of 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  solution at different pH values (with and without buffer) adjusted with HCl and NaOH (0.10  $\text{mol L}^{-1}$ ) varying from 4.00 up to 11.50 (buffer 0.01  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 4.00 and 5.75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 6.50 =  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ , 7.45–9.40 = Tris/Tris-HCl, 10.50 and 11.50 =  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) were percolated through the mini-columns at 5.0  $\text{mL min}^{-1}$ . Then, in the second step [Fig. 2(B)], the injector was commuted and 1.00  $\text{mol L}^{-1}$  HCl solution was used to elute the  $\text{Cu}^{2+}$  (from the polymer) towards the FAAS detector at 5.0  $\text{mL min}^{-1}$  flow rate. The experiments were carried out in triplicate and analytical blanks were also analyzed to evaluate some sample contamination.

### 2.9. Evaluation of exclusion properties of macromolecule by polymers

In order to evaluate the exclusion property of macromolecules, by polymers [ $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  and  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ ], BSA was selected as the model protein. 20.0 mL of 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  solution in the presence and absence of 0.50  $\text{g L}^{-1}$  BSA solutions at pH 4.75, 7.45 and 9.40 with and without buffer (buffer 0.01  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 4.75 =  $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 7.45 e 9.40 = Tris/Tris-HCl), at 5.0  $\text{mL min}^{-1}$  flow rate were percolated through the mini-columns. The column effluent from preconcentration step was collected and an UV-vis spectrophotometer PerkinElmer Lambda 25 (Massachusetts, USA) was used to monitor BSA protein at  $\lambda_{\text{max}}$  278 nm. The percentage of BSA exclusion was determined by the ratio of the absorbance of BSA in the effluent and the absorbance of original concentration of BSA, multiplying the result by 100. Upon preconcentration step, the elution was accomplished by using 1.00  $\text{mol L}^{-1}$  HCl solution. Upon preconcentration/elution step, a 1.00  $\text{mol L}^{-1}$  NaCl solution was percolated through the mini-columns to remove the remaining BSA.

### 2.10. Selectivity studies

Selectivity of IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> towards Cu<sup>2+</sup> (ionic radius: 71.0 pm) in the presence of potentially competitive ions such as Cd<sup>2+</sup> (ionic radius: 109.0 pm), Co<sup>2+</sup> (ionic radius: 88.5 pm), Fe<sup>2+</sup> (ionic radius: 92.0 pm), Ni<sup>2+</sup> (ionic radius: 83.0 pm), Pb<sup>2+</sup> (ionic radius: 133.0 pm) and Zn<sup>2+</sup> (ionic radius: 88.0 pm) was studied using binary solutions by batch procedures at room temperature (25 °C). These ions (intermediate and soft acids) were chosen due to their same charge (2+), similar size and ability to interact with sulfur and nitrogen atoms (soft bases) present in the allylthiourea structure. This study was carried out by placing 50.0 mg of each polymer separately in a falcon conical tube (50.0 mL) and then adding 25.0 mL of 5.0 mg L<sup>-1</sup> binary solutions (Cu<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>/Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>) without buffer at pH 4.50. The mixture was stirred for 40.0 min, centrifuged and the supernatant was removed for FAAS direct analysis. The distribution ratio ( $K_d$ ), selectivity ( $k_{IIP}$ ,  $k_{NIP}$ ) and the relative selectivity ( $k'$ ) coefficients were calculated according to Eqs. (6)–(9).

$$K_d = \frac{(C_i - C_f) V}{C_f m} \quad (6)$$

where  $C_i$  and  $C_f$  are the initial and final (supernatant) concentration of Cu<sup>2+</sup> and competitive metal ions (50.0 mg L<sup>-1</sup>),  $V$  is the solution volume (25.0 mL), and  $m$  is the polymer mass (50.0 mg);

$$k_{IIP} = \frac{K_d(\text{Cu}^{2+})}{K_d(\text{competitive ion})} \quad (7)$$

$$k_{NIP} = \frac{K_d(\text{Cu}^{2+})}{K_d(\text{competitive ion})} \quad (8)$$

$$k' = \frac{k_{IIP}}{k_{NIP}} \quad (9)$$

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polymers characterization

As the FT-IR spectra profiles of polymers synthesized in ACN and EtOH were very similar to each other, only the one prepared in ACN will be shown (Fig. 3). The one prepared in EtOH is shown in the supplemental material (Fig. S1).

FT-IR spectrum of ATU was also recorded for helping the identification of interaction modes with copper. In the spectrum of ATU, the absorption bands at 3440 and 1630 cm<sup>-1</sup> are attributed to the asymmetric vibration and deformation vibration of NH<sub>2</sub> group, respectively. The band at 1630 cm<sup>-1</sup> is also attributed to the vinyl group stretching vibration (H<sub>2</sub>C=CH-) and the absorption band observed at 1539 cm<sup>-1</sup> is attributed to the -HN-C<sup>+</sup>-S<sup>-</sup> ion stretching vibration, which was called the "thioureide ion" band by Randall et al. [38]. The absorption band at 1435 cm<sup>-1</sup> can be assigned to stretching vibration of N-C-N group and to asymmetric vibration of C=S [39,40]. The bands at 1320 and 1061 cm<sup>-1</sup> corresponds to the stretching vibration of C=S thio-carbonyl group [29,41], whereas the bands at 778 and 660 cm<sup>-1</sup> were attributed to double bond character of C=S [39]. Bands in the region of 567 and 449 cm<sup>-1</sup> are ascribed to asymmetric N-C-N bending vibration and symmetric deformation of (N-C=S) group [39,40]. When comparing the FT-IR spectra of ATU and the polymers, it can be seen that the bands mentioned above for pure ATU and attributed mainly to C=S, N-C-N and N-C=S groups, as the bands at 1320, 1061, 660 and 449 cm<sup>-1</sup>, were suppressed in the polymers spectra, while the bands at 1539, 1435, 750 and 521 cm<sup>-1</sup> were shifted. It deserves to point out that the bands at 750 and 521 cm<sup>-1</sup> for the polymer [NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>] were more intense compared with others polymers

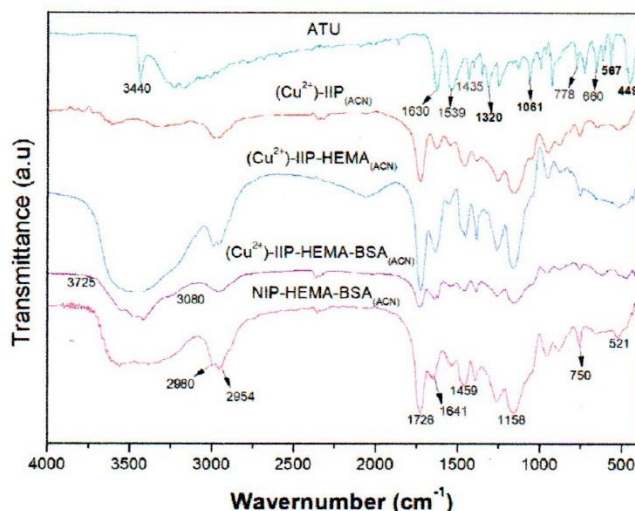


Fig. 3. FT-IR spectra of pure ATU and polymers (Cu<sup>2+</sup>-IIP, (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA, (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA-BSA, NIP-HEMA-BSA synthesized in acetonitrile.

containing copper in the polymeric network. This finding allows us to infer that coordination between the copper and ATU takes place through the sulfur atom in the C=S bond, thus confirming the literature data [29,42,43]. After coordination with copper, the C=S vibration is slightly changed because the C=S bond decreases its double bond character and the nature of C-N bond is increased [43,44].

The main functional groups present in the polymeric network ascribed to HEMA co-monomer and EGDMA cross-linker were also identified. The FT-IR spectra of (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA, (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA-BSA and NIP-HEMA-BSA presented a broad absorption band around 3725–3080 cm<sup>-1</sup>, corresponding to the O-H stretching vibration in combination with NH<sub>2</sub> stretching and vibration absorptions. The presence of two bands at 2980 and 2954 cm<sup>-1</sup> can be attributed to the C-H asymmetric stretching of -CH<sub>2</sub>- and -CH<sub>3</sub> in the polymer chain and EGDMA [45]. The intense absorption centered at 1728 cm<sup>-1</sup> was assigned to carbonyl groups vibration from EGDMA and HEMA, whereas at 1158 cm<sup>-1</sup> the asymmetric stretching vibration of -C-OH and -C-O-C- (ester) groups was observed [46]. The 1641 cm<sup>-1</sup> band confirms the presence of residual vinyl groups (CH<sub>2</sub>=CH-) in these polymers. The band at 750 cm<sup>-1</sup> confirmed the presence of thio-carbonyl group (C=S) in the polymers. It is important to mention that when the Cu<sup>2+</sup> was removed from the polymeric matrix, spectra (not shown) were obtained with a similar profile to those presented in the Fig. 3.

The thermal degradation behavior of polymers was evaluated by TG and DTG curves with and without the Cu<sup>2+</sup> removal from the polymer matrix (Fig. 4).

As observed in Fig. 4(A), (Cu<sup>2+</sup>-IIP<sub>(ACN)</sub>) and (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>) showed three well-defined decomposition stages, whereas (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>) and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> showed single decomposition stage. For (Cu<sup>2+</sup>-IIP<sub>(ACN)</sub>), (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>), (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>) and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, the removal of physically adsorbed water takes place in the temperature range 30–85 °C, with weight loss of 1.5%, 4.4%, 5.2% and 5.0%, respectively. From the results, and as expected, it can be observed that the polymers containing the hydrophilic compounds, HEMA co-monomer and BSA as external layer absorb more water as result of hydrogen bonding interactions. At the first decomposition stage, in the range of 165–270 °C, there is a slight weight loss of about, 8.3% for (Cu<sup>2+</sup>-IIP<sub>(ACN)</sub>) and 5.1% for (Cu<sup>2+</sup>-IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>) and maximum degradation rate at 225 °C (1.1%/min) and 224 °C (0.5%/min), respectively, which may be attributed to the volatilization of copper in the form of sulfide (CuS), the melting and boiling points of which are 103 °C and 220 °C, respectively [47,48]. The second event occurred in the

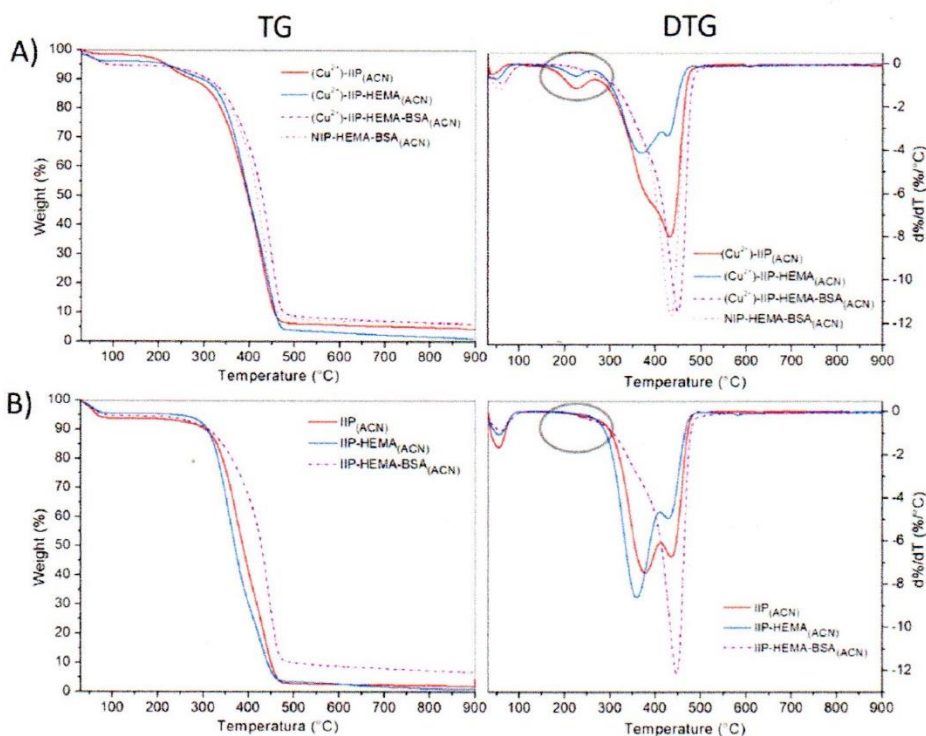


Fig. 4. TG (left) and DTG (right) curves for the polymers synthesized in acetonitrile: (A) in the  $\text{Cu}^{2+}$  presence and (B) in the  $\text{Cu}^{2+}$  absence.

temperature range of 270–412 °C, showing significant weight loss of 44.1% for  $\text{Cu}$ -IIP<sub>(ACN)</sub> with maximum degradation rate at 382 °C (5.9%/min) and 51.0% for  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> with maximum degradation rate at 368 °C (4.0%/min), corresponding to the decomposition of the ATU segments [41] and short chains. The last event observed between 412 °C and 485 °C can be attributed to the HEMA and EGDMA decarboxylation process [49], with maximum degradation rate at 433 °C (7.7%/min) and 427 °C (3.2%/min) and weight loss of 39.0% and 35.3% for  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(ACN)</sub> and  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, respectively.

A single degradation step for  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> was observed in the temperature range of 205–525 °C, with maximum decomposition rate at 450 °C (11.43%/min) and 435 °C (11.6%/min), and mass loss of 86.6% and 86.3%, respectively. The different thermal behavior for the polymers containing BSA can be rationalized bearing in mind the large number of interactions (electrostatic force, dipole-dipole interaction, the London dispersion force, hydrogen bonding and nonpolar bond), between the BSA protein and the functional groups present in the polymeric chain [50], thus yielding polymer chains interconnection. Thus, during the decomposition it is not possible to separately identify the ATU, HEMA and EGDMA segments, then manifesting a single event with a higher decomposition rate. Residual percentage of 7.1%, 4.2%, 8.2% and 8.7% were observed for  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(ACN)</sub>,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, respectively.

On the other hand, when the  $\text{Cu}^{2+}$  is removed from the polymer matrix [Fig. 4(B)], it was observed one thermal behavior similar to that obtained in the  $\text{Cu}^{2+}$  presence [Fig. 4(A)], with exception of the event that occurred in 165–270 °C for the  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(ACN)</sub> and  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> polymers, once the  $\text{Cu}^{2+}$  absence shift the degradation of the ATU for higher temperatures, occurring an overlapping of the events that can be observed in the inflection of the TG curve Fig. 4(B).

Similar thermal behavior was observed for the polymers synthesized in EtOH (data not shown). However,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(EtOH)</sub> did not present any event in the temperature range of 30–85 °C, which allows us to infer that this polymer presents hydrophobic characteristics, as will be further demonstrated in the wettability study.

SEM images of polymers are shown in Figs. 5 and 6. Clearly it can be observed great morphological differences among the polymers, which is attributed to the solvent nature, which in turn affects the textural data (Table 1).

The polymers synthesized in ACN (Figs. 5 and 6) exhibit, in general, particles with irregular shape. From a more careful observation with higher magnification (30000×), an aggregation of particles at nanoscale is noticed. On the other hand, the polymers particles synthesized in EtOH have spherical shape and higher cohesion, thus yielding spheres in micrometer scale. From these results, it is expected higher porosity to those polymers synthesized in ACN compared with the ones in EtOH, as shown in Table 1. Such morphological differences might be attributed to the higher solubility of ATU monomer in EtOH and to the phase separation during the polymerization initial stage.

During the polymer synthesis, the monomer first polymerizes in the presence of the crosslinker (EGDMA) and the radical initiator (AIBN), precipitating and forming particle nuclei (nanospheres). During growth of polymeric matrix, there exists competition between particle nuclei and solvated monomer by the porogenic solvent. Therefore, bearing in mind that the solubility of ATU monomer in EtOH is very pronounced, it is expected higher concentration of ATU in the porogenic solvent than in the polymerization nuclei, thus giving rise to larger, more cohesive particles and containing small pores [Fig. 6(B)]. On the other hand, the lower solubility of ATU monomers in ACN makes them more reactive into the already formed nuclei than in solvent medium, and as a result, these nuclei continue growing until the formation of highly cross-linked agglomerates with irregular shape. It must be also point out that, due to low interaction of ATU in ACN during growth of polymeric chain, the release of porogenic solvent became easier [51–54], thereby generating larger pores and higher surface area in the polymer (Table 1).

Table 1 shows clearly that the HEMA co-monomer decreases the  $S_{\text{BET}}$ ,  $V_T$  and  $D_p$  of the polymers synthesized in ACN. Such finding might be explained due to high hydrophilicity of HEMA becoming less solvated by ACN solvent and, therefore, the polymer particles grow from the nuclei with higher aggregation and size due to the interaction (hydrogen bonding) between the monomer, co-monomer and cross-

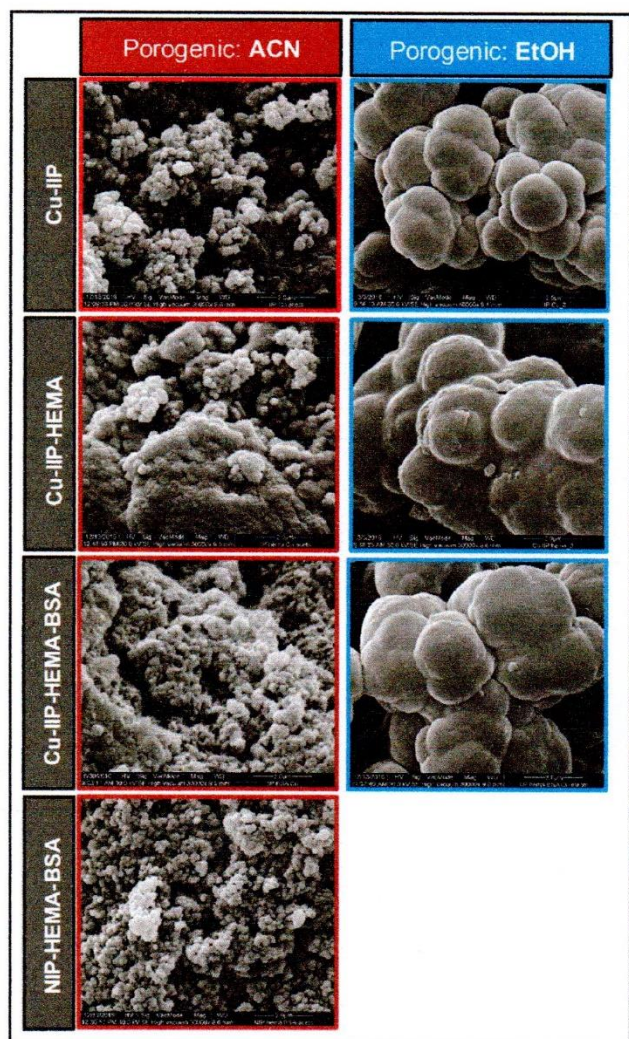


Fig. 5. SEM images (30000 times magnified with scale of 2.0  $\mu\text{m}$ ) showing the morphologies of polymers  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA and NIP-HEMA-BSA, synthesized in acetonitrile (ACN) and ethanol (EtOH) as porogenic solvents.

linking [55]. As result of higher aggregation and size, particles with lower surface area and lower interstices are obtained in the polymer structure. Upon coating with BSA of the polymer synthesized in ACN, it was noticed a significant decrease on the surface area as result of pores filling by BSA.

In relation to polymers synthesized in EtOH, it was observed an opposite behavior, because the HEMA addition and the coating with BSA produce an increase in the surface area and pore volume. Herein, it seems that due to the higher interaction between HEMA and EtOH makes the ATU-EtOH interaction weaker. Thus, due to the lower interaction of EtOH with growth of polymeric chain makes the solvent evaporation easier and, as result, higher porosity and surface area are obtained.

The BSA on the polymer surface confers a larger size to the particles and higher surface area, when compared with  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP<sub>(EtOH)</sub> and  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub>. From Table 1, it was also observed that that copper removal from the polymeric chain increases, as expected, the surface area of polymer.

According to the nitrogen adsorption-desorption isotherms profiles of the polymers and to the pore distribution obtained by the BJH method (supplemental material Figs. S2 and S3), all polymers are classified as mesoporous materials. The adsorption-desorption

isotherms obtained have a sigmoid shape of type V with hysteresis loops H2 and H3, which is typical of mesoporous adsorbents, where the adsorption on solid surface proceeds via multilayer adsorption followed by capillary condensation [30]. In the same way, from pore size distribution, the predominance of pores with a diameter between 3.05 and 28.12 nm was observed. These values allow to classify these polymers as mesoporous according to the IUPAC definition [56].

EDS spectra of  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA,  $(\text{Cu}^{2+})$ -IIP-HEMA-BSA and NIP-HEMA-BSA synthesized in ACN and EtOH are shown in supplemental material (Fig. S4). The spectra and elemental mapping confirmed the presence of Cu and S atoms presence in the polymeric chain with percentage values (wt%) ranging from 0.07 to 0.17% and 0.46–1.32%, respectively. Furthermore, the elemental mapping showed that the S atoms are distributed uniformly on the surface of the polymers, which favors the application of these materials as copper sorbent in preconcentration processes.

Considering that the polymers synthesized in ACN provided higher porosity and higher adsorption towards copper ions as will be further demonstrated, the CHNS elemental analysis was performed only for IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, and NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> materials. As these materials were also used to evaluate the imprinting effect, the determination of molar percentage (mmol%) of ATU monomer, HEMA co-monomer and EGDMA cross-linker in the polymeric chain from CHNS elemental analysis and stoichiometric calculation (Table 2) was very useful to predict whether the selectivity of polymers is attributed to imprinting effect or due to molar content of ATU. It should be noted that CHNS elemental analysis was not performed for the polymers IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> due to the diversity of atoms that makes up the BSA protein.

As observed in Table 2, the molar percentage (mmol%) of ATU after polymerization was slight lower when compared with starting monomer, resulting in a conversion rate of 76.9%, 77.5%, 78.8% and 78.1% for IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, respectively, whereas conversion rate of the EGDMA cross-linker reagent in the IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> polymers was found to be 105.8%, 105.6%, 103.4% and 103.5%, respectively. These results allow us to infer that the HEMA co-monomer presence in the synthesis had no significant influence on the ATU or EGDMA conversion rate. The very similar ATU content in the imprinted and non-imprinted polymer (IIP<sub>(ACN)</sub>/NIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>/NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>) indicates that any differences on selectivity of imprinted polymer is, in fact, attributed to the imprinted sites.

### 3.2. Wettability measurement

Fig. 7 shows the schematic diagram of assays to obtain the wettability of polymers. As observed, the polymers show high wettability, as the water droplet was spread on the surface of the polymers (contact angle is 0° or less than 90°), which allows to classify these materials into hydrophilic, with the exception of IIP<sub>(EtOH)</sub>. In the case of the hydrophilic polymers, the polymer-water cohesion forces are stronger than the cohesive forces between the water molecules and between the polymer particles, where a spontaneous spreading of the water drop occurs on the surface of the polymer. The presence of the HEMA co-monomer in the polymers IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, as expected, increases the hydrophilicity of the polymers surface, thus the cohesive forces between polymer and water becomes greater. On the other hand, it was observed that the water droplet did not spread completely on the surface of IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>, which may be attributed to a lower surface area and pore volume due to the presence of the BSA as external layer. As well, it was observed that when the water droplet comes into contact with the IIP<sub>(ACN)</sub> surface, a rapid surface disintegration occurs due to the strong polymer-water interaction, which is favored by the presence of rough surfaces [30,55]. Such result explains the salience of IIP<sub>(ACN)</sub> particles dispersed into water droplet.

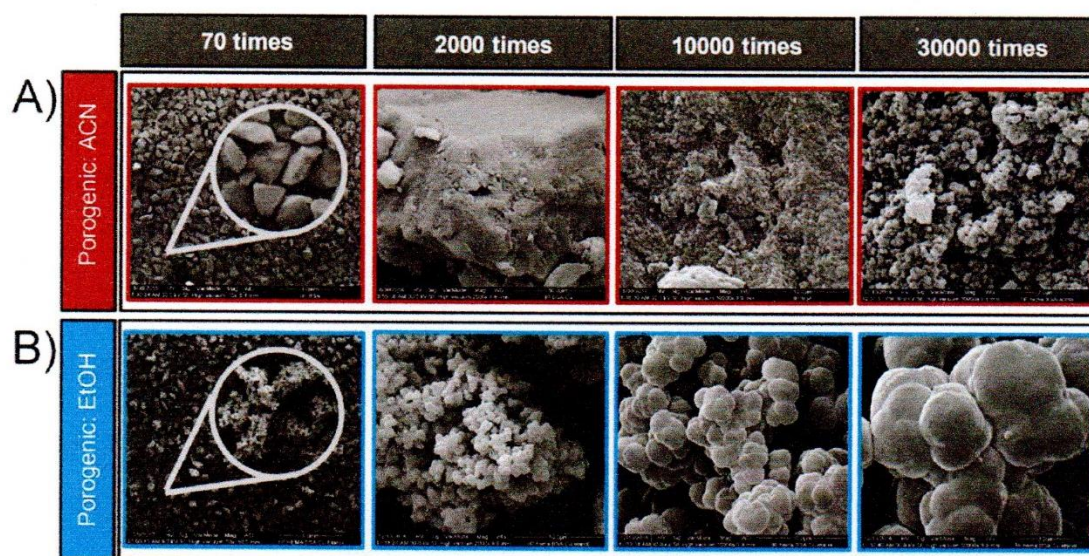


Fig. 6. SEM images at 70, 2000, 10000 and 30000 times magnified with scale of 1.0 mm, 50  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  and 2.0  $\mu\text{m}$ , respectively, of the Cu-IIP-HEMA-BSA polymer synthesized in A) acetonitrile and B) ethanol.

The hydrophobic feature of IIP<sub>(EtOH)</sub> might be attributed to its lower porosity which are characteristics of hydrophobic materials [32,33,57,58]. In addition, the reduced hydrophilicity of this material was also confirmed by thermogravimetric analysis (TGA).

### 3.3. Swelling analysis

The results from swelling analysis are shown in Table 3. It would be expected higher swelling capacity of IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> compared with IIP<sub>(ACN)</sub> taking into account the wettability measurements. However, such result was not observed, thus also indicating the porosity dependence on the swelling analysis. Comparing IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>/IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(EtOH)</sub>/IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>, it was noticed that the presence of BSA decrease the swelling effect as result of lower porosity of material, thus corroborating the wettability measurements.

On the basis of the wettability and swelling analysis, the polymers synthesized in ACN exhibit higher hydrophilicity compared with the ones synthesized in EtOH, which is of paramount importance in solid phase extraction process [34,59,60].

### 3.4. Point of zero charge (PZC)

The results of point of zero charge (PZC) are shown in supplemental material (Fig. S5). It was observed that  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  for IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub> polymers is between 6.50 and 6.57, while for IIP-HEMA-BSA<sub>(EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> the  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  is 4.95, 5.63 and 5.97, respectively. Therefore, the functional

Table 1  
Textural parameters obtained for the polymers.

Polymer	Surface area $-S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )		Pore volume $\times 10^{-1}$ ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )		Average pore diameter (nm)	
	ACN	EtOH	ACN	EtOH	ACN	EtOH
IIP	351.10	1.69	9.35	0.06	11.73	14.21
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP	224.70	1.16	10.37	0.04	19.14	16.17
IIP-HEMA	255.20	29.72	5.96	0.30	10.32	5.04
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA	222.60	17.41	7.67	0.22	14.48	5.96
IIP-HEMA-BSA	63.78	45.76	2.56	0.44	16.68	4.36
( $\text{Cu}^{2+}$ )-IIP-HEMA-BSA	52.03	27.99	2.13	0.35	16.98	5.82
NIP-HEMA-BSA	65.72	–	2.85	–	18.16	–

Table 2  
Molar composition (mmol%) of ATU, EGDMA and HEMA in the polymers IIP<sub>(ACN)</sub>, NIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> from elemental analysis CHNS.

Polymers	Composition (mmol%)					
	Initial			After polymerization		
	ATU	EGDMA	HEMA	ATU	EGDMA	HEMA
IIP <sub>(ACN)</sub>	20.00	80.00	–	15.38	84.62	–
NIP <sub>(ACN)</sub>	20.00	80.00	–	15.49	84.51	–
IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	16.67	66.66	16.67	13.13	68.94	17.92
NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	16.67	66.66	16.67	13.02	69.01	17.97

ATU = allylthiourea, EGDMA = ethylene glycol dimethacrylate, HEMA = 2-hydroxyethyl methacrylate.

groups (carbonyl and thiocarbonyl) that make up the IIP<sub>(ACN)</sub> surface tends to be protonated in pH values lower than 6.50 and the net charge of its surface will be more positive, whereas in values higher than 6.50 the surface tends to be deprotonated, acquiring net negative charge. Similarly, the surface of the others polymers may acquire positive or negative net charge depending of the decrease or increase of the pH value. The  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  values of IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> confirm the BSA presence in the polymers as external layer, since these values are near to the BSA isoelectric point value ( $\text{pH}_{\text{IEP}} = 4.70\text{--}5.60$ ) [61,62]. Thus, the surface net charge of IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> is BSA-dependent and from its

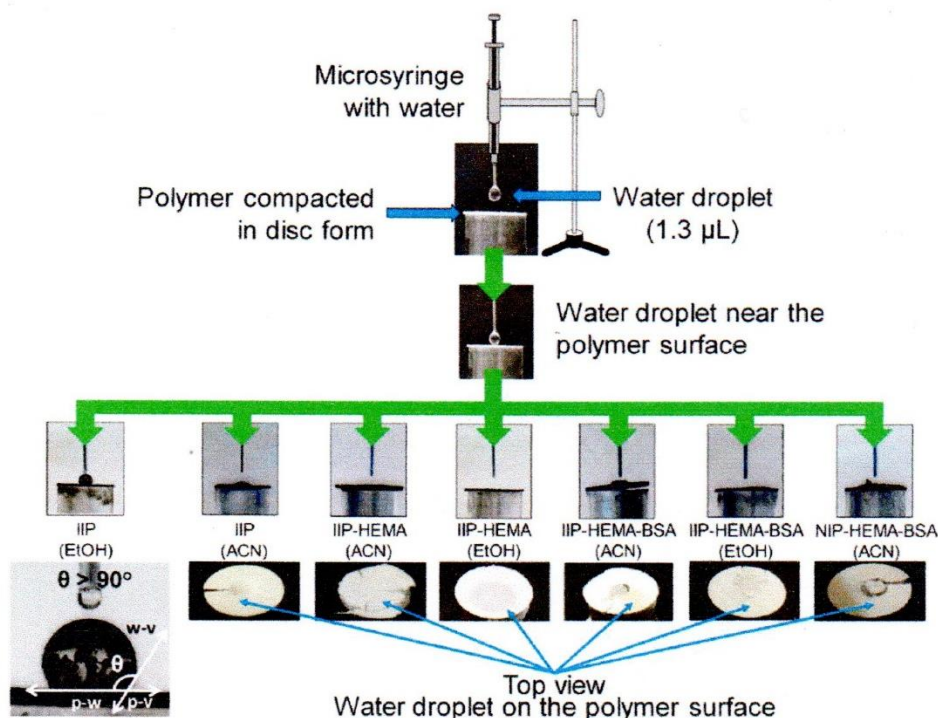


Fig. 7. Photographs of the static water droplet on polymers surfaces compacted in disc form. Interfaces: polymer-water (p-w), polymer-vapor (p-v) and water-vapor (w-v).

Table 3

Hydrophilic character of the polymers expressed as swelling ratio (SR%) at pH 6.80. Data are shown as means of 3 replicates  $\pm$  SD.

Polymer	SR (%)	
	ACN	EtOH
IIP	354.6 $\pm$ 3.9	37.7 $\pm$ 1.9
IIP-HEMA	265.6 $\pm$ 2.3	73.0 $\pm$ 2.0
IIP-HEMA-BSA	136.0 $\pm$ 2.4	55.7 $\pm$ 2.4
NIP-HEMA-BSA	138.9 $\pm$ 3.6	–

conformation changes. In this way, the positive net charge of the BSA at pH values between 2.70–3.75 and 3.75–4.50 is due to the F  $\rightarrow$  E and F  $\rightarrow$  N transition, respectively, as shown in supplemental material [Fig. S6(D)] [62,63]. Therefore, at low pH values, BSA is expanded, showing its functional groups with preponderance of disulfide loop and amine groups on its surface, whereas in the pH range between 5.60 and 7.00, the negative net charge is associated with the carboxylic groups deprotonation (N  $\rightarrow$  F transition) [64–66]. Therefore, the pH-dependence are of great importance when establishing the BSA binding sites with metals or with other molecules, since some bonds are exposed and others protected by the same conformation of the protein.

### 3.5. Influence of pH on Cu<sup>2+</sup> sorption

Fig. 8 shows the effect of pH on Cu<sup>2+</sup> sorption onto polymers using FIA-FAAS system.

Results indicate that the pH and buffer have a strong influence on Cu<sup>2+</sup> sorption onto the polymers. The low Cu<sup>2+</sup> sorption on the polymers synthesized in EtOH might be attributed to their lower porosity and lower swelling capacity, which are unfavorable conditions for Cu<sup>2+</sup> ions interpenetration towards the reactive functional groups anchored on the polymers. In addition, compared with measures in the absence of buffer solution, a significant decrease in the Cu<sup>2+</sup> signal was observed

to the ones performed in buffer solution, thus suggesting the strong interaction with buffer anion and Cu<sup>2+</sup> and making the diffusion of metal towards binding sites more difficult.

On the other hand, Cu<sup>2+</sup> ions absorbance signal for those polymers synthesized in ACN was higher in the presence of buffer solution. This behavior might be most likely attributed to the higher porosity and hydrophilicity of polymers, which in turn provides a better buffer capacity of buffer solution and pH stability during preconcentration, favoring the interaction Cu<sup>2+</sup>-ATU in the IIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> polymers.

It was noticed for IIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> that with increase of pH (4.00–6.50), the sorption of Cu<sup>2+</sup> gradually increased and in the pH range (7.00–11.50), in the presence of buffer solution, the sorption was decreased. In the absence of buffer solution, sorption of Cu<sup>2+</sup> onto these polymers was too much low and pH-independent.

The influence of pH on sorption of Cu<sup>2+</sup> onto IIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> might be explained by the copper availability in the respective solutions and the ATU tautomeric equilibrium [see supplemental material Fig. S6(A) and S6(B)]. In acidic medium, surface functional groups (thiol form) are protonated, repelling positively with Cu<sup>2+</sup> ions, which is the dominant species at low pH values up to pH 7.5. At pH 6.50, near to the pHPZC of IIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>, the coordination copper-sulfur is favored, since the sulfur atoms of ATU (thione form) have a pair of electrons available ( $\sigma$ -donor ability) (HOMO: highest-energy occupied molecular orbital) that can bind with the Cu<sup>2+</sup> ions (LUMO: lowest-energy unoccupied molecular orbital), via the chelation [supplemental material Fig. S6(C)] [67]. Above pH 6.55 the surface of the polymers becomes negatively charged due to the ATU deprotonation (anion thiolate). However, at low concentrations and pH > 7.50, the majority species of copper is in the form of [Cu(OH)<sup>+</sup>], which decreases the interaction with sulfur atom. For more alkaline medium the sorption decreases due to the precipitation of Cu<sup>2+</sup> ions as Cu(OH)<sub>2</sub> form ( $K_{ps} = 4.8 \times 10^{-20}$ ) [68].

It is worth emphasize that the higher sorption of Cu<sup>2+</sup> took place in the IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> sorbents due to the strong interaction between Cu<sup>2+</sup> and the BSA external layer through

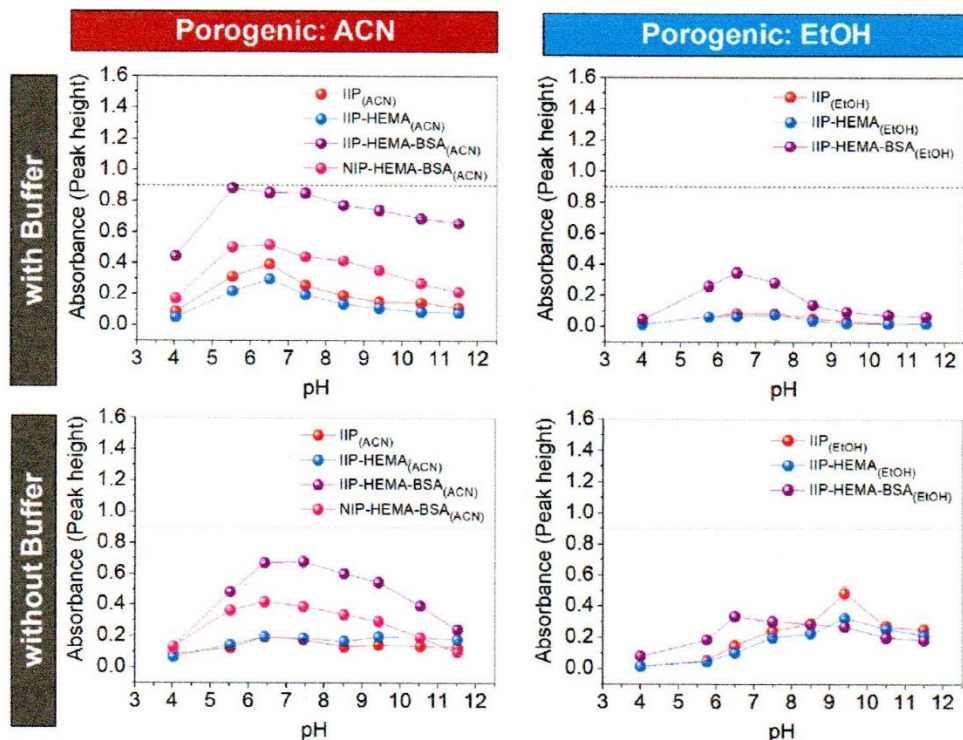


Fig. 8. pH effect on the  $\text{Cu}^{2+}$  ions absorbance signal using the  $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  and  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  polymers in flow injection pre-concentration system. Conditions: mass of polymer: 50.0 mg; concentration of  $\text{Cu}^{2+}$   $100.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; pre-concentration volume: 20.0 mL; pre-concentration/elution flow rate:  $5.0 \text{ mL min}^{-1}$ ; buffer concentration:  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4.00 and 5.75 =  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH 6.50 =  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7.45 – 9.40 =  $\text{Tris-HCl}$ , 10.50 and 11.50 =  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); eluent:  $1.00 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{HCl}$ .

disulfide bridges [69]. The presence of buffer produces conformational changes (isomer transition  $\text{N} \rightarrow \text{F}$ ) on BSA secondary and tertiary structures induced by ionic strength, with exposure of the disulfide bridges and carboxylic groups deprotonation [Fig. S6(D)] [70], favoring the  $\text{Cu-BSA}$  interaction and the  $\text{Cu}^{2+}$  ions interpenetration towards the cavities of the polymer matrix, and, as consequence, higher absorbance signal with pH-value shifted to 5.50.

However, lower signals of  $\text{Cu-BSA}$  in the presence of buffer solution compared to the ones in absence of buffer solution were observed. Thus, the feasibility of polymers for  $\text{Cu}^{2+}$  sorption with simultaneous macromolecule (BSA) exclusion was investigated by pre-concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu-BSA}$  in the absence of buffer solution (Fig. 9). As one can see, for all polymers, the copper signal in the presence of BSA remained leveled off or decreased with the increase of pH from 7.45 to 9.40, due to the repulsion between the negative charges of the adsorbent surface and BSA protein in solution. In this way, the BSA in solution is excluded together with the copper, resulting at low absorbance signal. Nevertheless, at pH 4.75, higher copper signal was obtained when  $\text{Cu}^{2+}$  ions were pre-concentrated in the presence of BSA using  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  and  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ . It seems most likely that copper coordinates with BSA at the N-terminal peptides (square-planar complex) and at the same time interacts with the functional groups of the polymer surface, acting as a bridge between the polymer and the BSA, and thus justifying the higher sorption. In turn, the BSA protein at pH 4.75 can interact with others  $\text{Cu}^{2+}$  ions through its 17 disulfide bonds (weak bond sites), which causes an increase in the absorbance signal [69]. The copper signals in the absence and presence of BSA were very similar each other when using the  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  sorbent. In this case, it seems that such sorbent is capable to retain copper ions and to exclude BSA from the solution. In spite of similar results achieved for the  $\text{IIP}_{(\text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{EtOH})}$  and  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{EtOH})}$  the copper sorption was found to be too much low, as result of their low porosity and more hydrophobic characteristics.

### 3.6. Evaluation of exclusion properties of macromolecule by polymers

Fig. 10 shows the exclusion percentages of BSA (91.8% to 100.3%) by

using the polymers synthesized in ACN and EtOH. As observed, the lowest exclusion percentages of BSA were obtained for the polymers  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  and  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  that provided the highest signal for copper during the pre-concentration in the presence of BSA. Such outcome allows us to confirm that a portion of the BSA is bonded to the  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  and  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  sorbents through copper as mentioned.

At pH 4.75 the BSA exclusion mechanism takes place by chemical diffusion barrier due to the hydrophilic/hydrophobic properties of the polymers surface and BSA protein [15]. The water external layer of the polymers  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  e  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  and the BSA hydration water (Stokes radius = 3.39 nm) form a hydrophilic barrier [71], which prevents the protein access to the polymer matrix and favors the  $\text{Cu}^{2+}$  interaction with the polymer. Regarding the  $\text{IIP}_{(\text{EtOH})}$ , the reason for BSA exclusion is attributed to the lower hydrophobicity of polymer, which prevents the retention of hydrated BSA but, as a collateral effect, the copper sorption becomes too much low. Even though high exclusion percentage of BSA was obtained for all polymers, the  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  sorbent was the only one that provided at pH 4.75, similar signals for copper when pre-concentrated in the presence and the absence of BSA in solution, with simultaneous protein exclusion. Therefore, a narrower pH range (4.00–5.00) was investigated so that copper signal in the absence and presence of BSA is as close as possible. Fig. 11 shows that copper signal alone and  $\text{Cu-BSA}$  at pH 4.50 are closer each other than that ones at pH 4.75, because the BSA protein at  $\text{pH} < \text{pH}_{\text{IEP}}$  changes its structural conformation ( $\text{N} \rightarrow \text{F}$ ), thereby giving rise to increase of the positive charge on BSA and lower interaction with  $\text{Cu}^{2+}$  ions. Therefore, pH 4.50 without buffer was selected as the optimal pH value for further experiments.

### 3.7. Selectivity studies

From the selectivity studies, the  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  sorbent did not exhibit selectivity for  $\text{Cu}^{2+}$  compared with  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$ , once values of  $k'$  were lower than 1.0 (data not show) for binary mixture  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  due to the BSA external layer non-selective interaction with competing cations via both  $-\text{COOH}$  and N-terminal ( $\alpha\text{-NH}_2$ ).

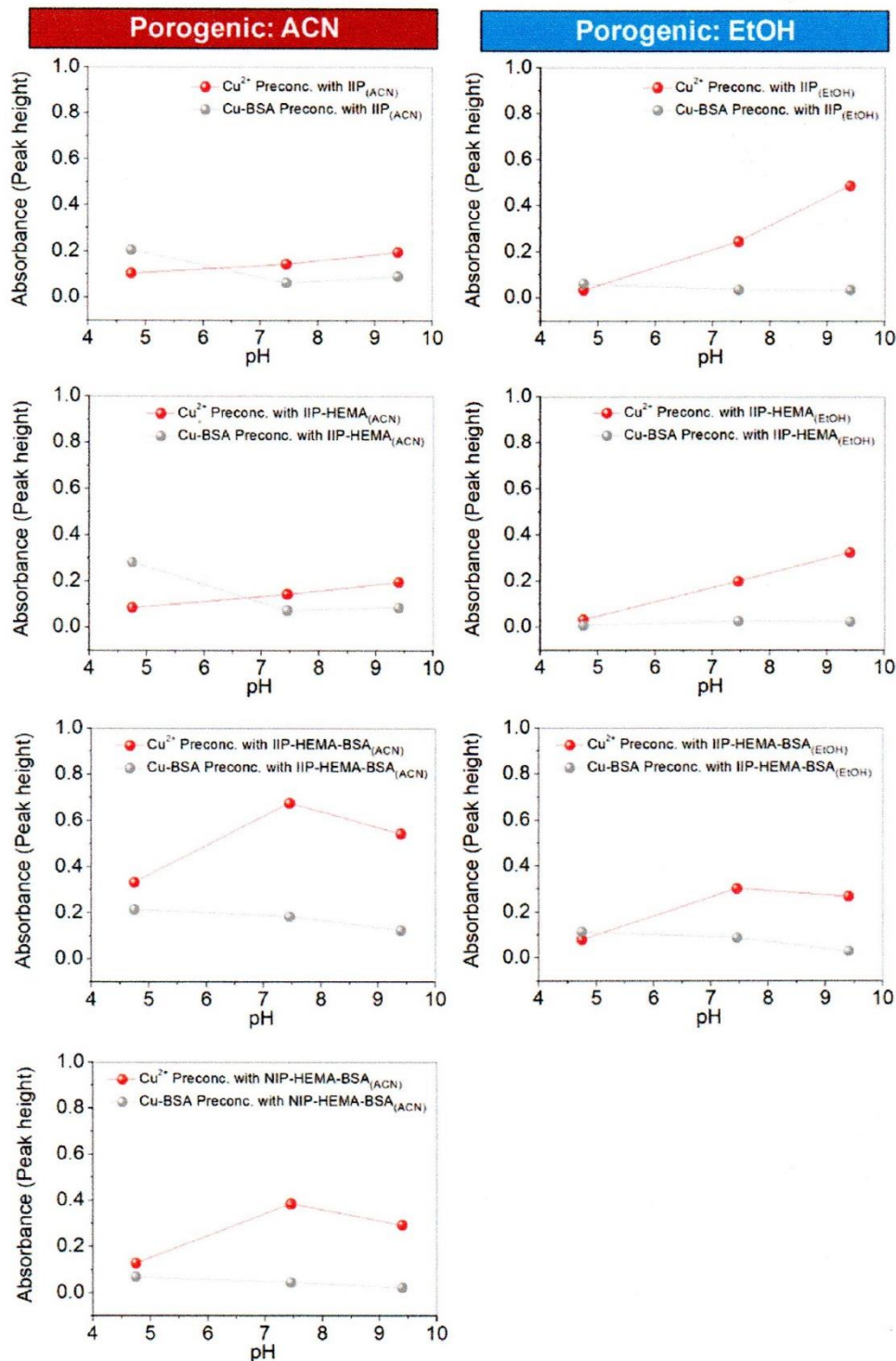


Fig. 9. Effect of pH on  $\text{Cu}^{2+}$  absorbance signal in the presence and absence of  $0.50 \text{ g L}^{-1}$  BSA at pH 4.75, 7.45 and 9.40 without buffer using the  $\text{IIP}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$ ,  $\text{IIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN}, \text{EtOH})}$  and  $\text{NIP-HEMA-BSA}_{(\text{ACN})}$  polymers in flow injection preconcentration system. Conditions: mass of polymer:  $50.0 \text{ mg}$ ; concentration of  $\text{Cu}^{2+}$   $100.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; preconcentration volume:  $20.0 \text{ mL}$ ; preconcentration/elution flow rate:  $5.0 \text{ mL min}^{-1}$ ; eluent:  $1.00 \text{ mol L}^{-1}$  HCl.

Table 4 and Fig. S7 (supplemental material) shows the distribution ratio ( $K_d$ ), selectivity coefficient ( $k$ ) and relative selectivity coefficient ( $k'$ ) for the ion-imprinted polymers [ $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ ] and the control non-imprinted polymers [ $\text{NIP}_{(\text{ACN})}$ ,  $\text{NIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$ ], obtained from the binary solutions of  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  at  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  concentration.

The relative selectivity coefficient ( $k'$ ) value of each binary mixture

shows that  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  have higher selectivity toward  $\text{Cu}^{2+}$  ions than  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  in the presence of the others divalent cations. It may be attributed to the interaction between HEMA and  $\text{Cu}^{2+}$  ion during the synthesis, which interferes in the creation of imprinted cavities in  $\text{IIP-HEMA}_{(\text{ACN})}$  [20]. Additionally,  $k$  values for  $\text{IIP}_{(\text{ACN})}$  are larger than for the  $\text{NIP}_{(\text{ACN})}$  in the presence of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , and lower in the presence  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ . It may be explained by the higher

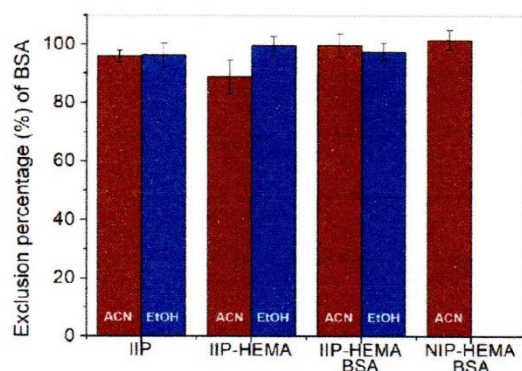


Fig. 10. Exclusion percentage (%) of BSA by the IIP<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN, EtOH)</sub>, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN, EtOH)</sub> and NIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> polymers at pH 4.75.

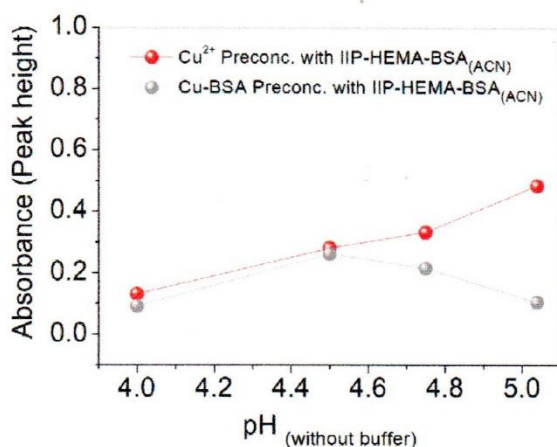


Fig. 11. Absorbance signal of the Cu<sup>2+</sup> preconcentration in the presence and absence of 0.50 g L<sup>-1</sup> BSA at pH 4.00, 4.50, 4.75 and 5.00 without buffer using the IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> polymer in flow injection preconcentration system. Conditions: mass of polymer: 50.0 mg; concentration of Cu<sup>2+</sup> 100.0 μg L<sup>-1</sup>; preconcentration volume: 20.0 mL; preconcentration/elution flow rate: 5.0 mL min<sup>-1</sup>; eluent: 1.00 mol L<sup>-1</sup> HCl.

interaction between the C=S functional group (soft base) and soft acid (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>), forming complex more readily than with borderline, or hard acids, (Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), according to hard-soft acid-base classification of metal ions and ligands of Pearson [72]. Although Cu<sup>2+</sup> belongs to the same classification as the ions Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, the selectivity of IIP<sub>(ACN)</sub> towards Cu<sup>2+</sup> ions is ascribed by the coordination-geometry and by the size of imprinted cavity, whereas Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions have larger size than Cu<sup>2+</sup> ion (71.0 pm) with ionic radius values of 88.5, 92.0, 83.0 and 88.0 pm, respectively.

For final remarks, it is important to point out that sulfur ratio in the polymers IIP<sub>(ACN)</sub>/NIP<sub>(ACN)</sub> and IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>/NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub> according to elemental analysis CHNS was the same, thereby allowing us to attest once again that selectivity of IIP<sub>(ACN)</sub> towards Cu<sup>2+</sup> is attributed to imprinting effect without dependence of molar content of ATU.

#### 4. Conclusion

This work revealed great dependence of Cu<sup>2+</sup> sorption with respect to polarity of the porogenic solvent used during polymerization. Polymers with higher porosity and hydrophilic characteristics were obtained by using ACN compared with EtOH, and as consequence provided higher Cu<sup>2+</sup> sorption. Cu-IIP<sub>(ACN)</sub> can selectively retain Cu<sup>2+</sup> ions more effectively than its respective non-imprinted polymer (NIP). However, the imprinting effect decreases with the insertion of HEMA in

Table 4

Distribution ratio ( $K_d$ ), selectivity coefficient ( $k$ ) and relative selectivity coefficient ( $k'$ ) values of Cu<sup>2+</sup> ion-imprinted polymer [IIP<sub>(ACN)</sub>, IIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] and control non-imprinted polymer [NIP<sub>(ACN)</sub>, NIP-HEMA<sub>(ACN)</sub>] for different cations (M<sup>2+</sup>).

Binary mixtures	Polymer	$K_d$		$k$	$k'$
		Cu <sup>2+</sup>	M <sup>2+</sup>		
Cu <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	18.5	1.5	12.35	1.9
	NIP <sub>(ACN)</sub>	33.7	5.3	6.36	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1471.4	628.5	2.34	0.9
Cu <sup>2+</sup> /Co <sup>2+</sup>	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1215.1	469.9	2.59	
	IIP <sub>(ACN)</sub>	20.7	7.1	2.91	3.7
	NIP <sub>(ACN)</sub>	37.3	47.8	0.78	
Cu <sup>2+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	258.7	429.0	0.60	1.2
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	384.3	733.0	0.52	
	IIP <sub>(ACN)</sub>	29.2	347.5	0.08	2.8
Cu <sup>2+</sup> /Ni <sup>2+</sup>	NIP <sub>(ACN)</sub>	47.7	1613.0	0.03	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1237.4	2071.2	0.60	2.1
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1964.8	6856.5	0.29	
Cu <sup>2+</sup> /Pb <sup>2+</sup>	IIP <sub>(ACN)</sub>	17.4	8.8	1.98	4.7
	NIP <sub>(ACN)</sub>	21.8	51.4	0.42	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	454.2	206.7	2.20	0.6
Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	948.5	243.8	3.89	
	IIP <sub>(ACN)</sub>	21.7	13.4	1.62	1.0
	NIP <sub>(ACN)</sub>	37.1	22.1	1.68	
Cu <sup>2+</sup> /Pb <sup>2+</sup>	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	258.7	429.0	0.60	1.2
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	384.3	733.0	0.52	
	IIP <sub>(ACN)</sub>	12.9	7.6	1.70	7.1
Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	NIP <sub>(ACN)</sub>	21.4	90.0	0.24	
	IIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	719.1	65.6	10.97	2.8
	NIP-HEMA <sub>(ACN)</sub>	1283.9	331.6	3.87	

the polymerization mixture, as well as with BSA coating. All polymers, with and without RAM, are capable to exclude protein, but not all of them can sorb Cu<sup>2+</sup> in the presence of BSA in solution. In this study, IIP-HEMA-BSA<sub>(ACN)</sub> was the most efficient polymer for simultaneous Cu<sup>2+</sup> preconcentration and BSA protein exclusion in aqueous medium. Therefore, as a final remark, we believe that this study greatly contributed in the field of chemical imprinting technology with focus on adequate combination of IIP and RAM properties to obtain a single material capable of retaining metal ions with macromolecules exclusion. Bearing in mind the promising results, our research group is engaged in direct Cu<sup>2+</sup> determination in biological fluids and food samples without matrix interference using an FIA-FAAS system.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant No. 481669/2013-2, 305552/2013-9, 307432/2017-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (25/2014), Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI), SANEPAR, Laboratório de Espectroscopia da Central de Multusuário da PROPPG and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCT) (Grant No. 573672/2008-3) for their financial support and fellowships.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.176>.

#### References

- [1] G. Wulff, A. Sarhan, The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 11 (1972) 341–344.
- [2] H. Nishide, J. Deguchi, E. Tsuchida, Selective adsorption of metal-ions on cross-linked poly(vinylpyridine) resin prepared with a metal-ion as a template, *Chem. Lett.* 5 (1976) 169–174.

- [3] K. Haupt, Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst* 126 (2001) 747–756.
- [4] L.D. Marestoni, M.G. Segatelli, M.P.T. Sotomayor, L.R. Sartori, C.R.T. Tarley, Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica, *Quim. Nova* 36 (2013) 1194–1207.
- [5] C.R.T. Tarley, M.P.T. Sotomayor, L.T. Kubota, Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação, *Quim. Nova* 28 (2005) 1076–1086.
- [6] L. Pauling, A theory of the structure and process of formation of antibodies, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 2643–2657.
- [7] E.C. Figueiredo, A.C.B. Dias, M.A.Z. Arruda, Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos, *RBCF* 44 (2008) 361–375.
- [8] C. Branger, W. Meouche, A. Margaillan, Recent advances on ion-imprinted polymers, *React. Funct. Polym.* 73 (2013) 859–875.
- [9] J. Wackerlig, R. Schirhagl, Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: a review, *Anal. Chem.* 88 (2016) 250–261.
- [10] I.D. Souza, L.P. Melo, L.C.S.F. Jardim, J.C.S. Monteiro, A.M.S. Nakano, M.E.C. Queiroz, Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples, *Anal. Chim. Acta* 932 (2016) 49–59.
- [11] R.T. Prasada, S. Daniel, J.M. Gladis, Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE), *TrAC* 23 (2004) 28–35.
- [12] F. Shakerian, K.-H. Kim, E. Kwon, J.E. Szulejko, P. Kumard, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, Advanced polymeric materials: synthesis and analytical application of ion imprinted polymers as selective sorbents for solid phase extraction of metal ions, *TrAC* 83 (2016) 55–69.
- [13] J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka, Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 331–339.
- [14] I.H. Hagestam, T.C. Pinkerton, Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography, *Anal. Chem.* 57 (1905) 1757–1763.
- [15] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 141–156.
- [16] N.M. Cassiano, V.V. Lima, R.V. Oliveira, A.C. Pietro, Q.B. Cass, 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.* 384 (2006) 1462–1469.
- [17] F.M. Oliveira, M.G. Segatelli, C.R.T. Tarley, Evaluation of a new water-compatible hybrid molecularly imprinted polymer combined with restricted access for the selective recognition of folic acid in binding assays, *J. Appl. Polym. Sci.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1002/app.43463>.
- [18] V.R.J. Acquaro, D.S. Domingues, M.E.Q. Costa, Column switching UHPLC-MS/MS with restricted access material for the determination of CNS drugs in plasma samples, *Bioanalysis* 9 (2017) 555–568.
- [19] H.D. de Faria, L.C.C. Abrão, M.G. Santos, A.F. Barbosa, E.C. Figueiredo, New advances in restricted access materials for sample preparation: a review, *Anal. Chim. Acta* 959 (2017) 43–65.
- [20] F. Puoci, F. Iemina, G. Cirillo, M. Curcio, O.I. Parisi, U.G. Spizzirri, N. Picci, New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 634–1640.
- [21] G.O.I. Moraes, L.M.R. Silva, A.J. Santos-Neto, F.H. Florenzano, E.C. Figueiredo, 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.* 405 (2013) 7687–7696.
- [22] O.I. Parisi, G. Cirillo, M. Curcio, F. Puoci, F. Iemina, U.G. Spizzirri, N. Picci, Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media, *J. Polym. Res.* 17 (2010) 355–362.
- [23] H. Sanbe, J. Haginaka, Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of b-blockers in biological fluids, *Analyst* 128 (2003) 593–597.
- [24] B. Du, T. Qu, Z. Chen, X. Cao, S. Han, G. Shen, L. Wang, A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples, *Talanta* 129 (2014) 465–472.
- [25] F.M. Oliveira, M.G. Segatelli, C.R.T. Tarley, Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples, *Anal. Meth.* 8 (2016) 656–665.
- [26] M.G. Santos, G.O.I. Moraes, M.G. Nakamura, A.J. Santos-Neto, E.C. Figueiredo, Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers’ external layers: a comparison related to physical and chemical properties, *Analyst* 140 (2015) 7768–7775.
- [27] C. Cui, M. He, B. Chen, B. Hu, Restricted accessed material-copper(II) ion imprinted polymer solid phase extraction combined with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry for the determination of free Cu(II) in urine and serum samples, *Talanta* 116 (2013) 1040–1046.
- [28] S. Mandal, G. Das, R. Singh, R. Shukla, P.K. Bharadwaj, Synthesis and studies of Cu(II)-thiolato complexes: bioinorganic perspectives, *Coord. Chem. Rev.* 160 (1997) 191–235.
- [29] N. Karthik, M.G. Sethuraman, Surface protection of copper by allylthiourea and hybrid sol-gel coatings, *Prog. Org. Coat.* 90 (2016) 380–389.
- [30] M. Thommes, K. Kaneko, A.V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069.
- [31] A.H. Basta, V. Fierro, H. El-Saied, A. Celzard, 2-Steps KOH activation of rice straw: an efficient method for preparing high-performance activated carbons, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3941–3947.
- [32] A.P. Luz, S. Ribeiro, V.C. Pandolfelli, Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários, *Cerâmica* 54 (2008) 174–183.
- [33] Y. Yuan, T.R. Lee, Contact angle and wetting properties, in: G. Bracco, B. Holst (Eds.), *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences, London, 2013, pp. 3–34.
- [34] G. Parameswaran, B. Mathew, Bioremediation of waste water containing hazardous cadmium ion with ion imprinted interpenetrating polymer networks, *Adv. Environ. Chem.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1155/2014/394841>.
- [35] B.M. Babic, S.K. Milonjic, M.J. Polovina, B.V. Kaludjerovic, Point of zero charge and intrinsic equilibrium constants of activated carbon cloth, *Carbon* 37 (1999) 477–481.
- [36] C.E.A. Carneiro, F.F. Ivashita, I.G.J. Souza, C.M.D. Souza, A. Paesano, A.C.S. Costa, E. Di Mauro, H. Santana, C.T.B.V. Zaia, D.A.M. Zaia, Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study, *Int. J. Astrobiol.* 12 (2013) 149–160.
- [37] Z. Fang, T. Guot, B. Welz, determination of cadmium, lead and copper in water samples by flame atomic-absorption spectrometry with preconcentration by flow-injection on-line sorbent extraction, *Talanta* 38 (1991) 613–619.
- [38] H.M. Randall, R.G. Fowler, N. Fuson, R. Dangle, *Infrared Determination of Organic Structures*, Van Nostrand Company, New York, 1949.
- [39] N.R. Dhumane, S.S. Hussaini, V.G. Dongre, P.P. Karmuse, M.D. Shirsat, Growth and characterization of glycine doped bis thiourea cadmium chloride single crystal, *Cryst. Res. Technol.* 44 (2009) 269–274.
- [40] K.A. Jesen, P.H. Nielsen, Infrared spectra of thioamides and selenoamides, *Acta Chem. Scand.* 20 (3) (1966) 597–629.
- [41] C. Li, C. Feng, M. Li, Q. Zeng, H. Yang, Synthesis and Characterization of a surface-grafted Cd(II) ion-imprinted polymer for selective separation of Cd(II) ion from aqueous solution, *Appl. Surf. Sci.* 332 (2015) 463–472.
- [42] S. Mishra, N. Verma, Surface ion imprinting-mediated carbon nanofiber-grafted highly porous polymeric beads: synthesis and application towards selective removal of aqueous Pb(II), *Chem. Eng. J.* 313 (2017) 1142–1151.
- [43] G.-L. Chen, H. Lin, J.H. Lu, Li. Wen, J.-Z. Zhou, Z.-H. Lin, SERS and EQCM studies on the effect of allylthiourea on copper dissolution and deposition in aqueous sulfuric acid, *J. Appl. Electrochem.* 38 (2008) 1501–1508.
- [44] P.M. Ushasree, R. Muralidharan, R. Jayavel, P. Ramasamy, Growth of bis(thiourea) cadmium chloride single crystals a potential NLO material of organometallic complex, *J. Cryst. Growth* 218 (2000) 365–371.
- [45] F.M. Oliveira, B.F. Somera, E.S. Ribeiro, M.G. Segatelli, M.J. Yabe, E. Galunin, C.R.T. Tarley, Kinetic and isotherm studies of Ni<sup>2+</sup> adsorption on poly(methacrylic acid) synthesized through a hierarchical double-imprinting method using a Ni<sup>2+</sup> ion and cationic surfactant as templates, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 8550–8557.
- [46] W. Meouche, K. Laatikainen, A. Margaillan, T. Silvonon, H. Siren, T. Sainiom, I. Beurroies, R. Denoyel, C. Branger, Effect of porogen solvent on the properties of nickel ion imprinted polymer materials prepared by inverse suspension polymerization, *Eur. Polym. J.* 87 (2017) 124–135.
- [47] R.C. Weast, *Handbook of chemistry and physics*, A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data, 25th ed., CRC Press, Ohio, 1974.
- [48] P. Walker, W.H. Tarn, *Handbook of Metal Etchants*, CRC Press LLC, Florida, 1991.
- [49] P. Lulinski, P. Kalny, J. Giebutowicz, D. Maciejewska, P. Wroczynski, Synthesis and characterization of cadmium(II)-imprinted poly(1-allyl-2-thiourea-co-ethylene glycol dimethacrylate) particles for selective separation, *Polym. Bull.* 71 (2014) 1727–1741.
- [50] R.H. McMenamy, Albumin Binding Sites, in: V.M. Rosener, M. Oratz, M.A. Rothschild (Eds.), *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press Inc, Oxford, 1977, pp. 144–147.
- [51] S. Mane, Effect of porogens (type and amount) on polymer porosity: a review, *Canad. Chem. Trans.* 4 (2016) 210–225.
- [52] R. Vendamme, W. Eevers, M. Kaneto, Y. Minamizaki, Influence of polymer morphology on the capacity of molecularly imprinted resins to release or to retain their template, *Polym. J.* 41 (2009) 1055–1066.
- [53] S. Mane, S. Ponrathnam, N. Chava, Role of interfacial tension of solvating diluents and hydrophilic–hydrophobic cross-linkers in hyper-cross-linked solid supports, *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 6893–6901.
- [54] Y. Suzhu, L.N. Fem, C.C.M. Khin, A.M. Aye, L.N. Feng, Y.N. Yen, Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 2641–2647.
- [55] D. Horak, F. Lednický, V. Rehak, F. Svec, Porous polyHEMA beads prepared by suspension polymerization in aqueous medium, *J. Appl. Polym. Sci.* 49 (1993) 2041–2050.
- [56] B.D. Zdravkov, J.J. Gernak, M. Sefara, J. Janku, Pore classification in the characterization of porous materials: a perspective, *Cent. Eur. J. Chem.* 5 (2007) 385–395.
- [57] B. He, N.A. Patankar, J. Lee, Multiple equilibrium droplet shapes and design criterion for rough hydrophobic surfaces, *Langmuir* 19 (2003) 4999–5003.
- [58] C.-W. Yao, J.L. Alvarado, C.P. Marsh, B.G. Jones, M.K. Collins, Wetting behavior on hybrid surfaces with hydrophobic and hydrophilic properties, *Appl. Surf. Sci.* 290 (2014) 59–65.
- [59] A. Sienkiewicz, P. Krasucka, B. Charnas, W. Stefaniak, Swelling effects in cross-linked polymers by thermogravimetry, *J. Therm. Anal. Calorim.* 130 (2017) 85–93.

- [60] N.B. Tran, J.Y. Kim, Y.-C. Kim, Y.J. Kim, J.-H. Kim, CO<sub>2</sub>-responsive swelling behavior and metal-ion adsorption properties in novel histamine-conjugated poly-aspartamide hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci.* **133** (2016), <http://dx.doi.org/10.1002/APP.43305>.
- [61] C. Tanford, J.G. Buzzel, The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5, *J. Phys. Chem.* **60** (1956) 225–231.
- [62] T. Peters, *All About Albumins: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, first ed., Academic Press, San Diego-CA, 1996.
- [63] K. Nakamura, S. Era, Y. Ozaki, M. Sogami, T. Hayashi, M. Murakami, Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by raman spectroscopy, *FEBS Lett.* **417** (1997) 375–378.
- [64] L.R.S. Barbosa, M.G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, R. Iuri, The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle x-ray scattering study, *Biophys. J.* **98** (2010) 147–157.
- [65] J.F. Foster, Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin, in: V.M. Rosencroft, M. Oratz, M.A. Rothschild (Eds.), *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press Inc, Oxford, 1977, pp. 53–84.
- [66] R.A.B. Gomes, P.O. Luccas, C.S. Magalhães, E.C. Figueiredo, Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin, *J. Mater. Sci.* **51** (2016) 7407–7414.
- [67] C. Belle, W. Rammal, J.-L. Pierre, Sulfur ligation in copper enzymes and models, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1929–1936.
- [68] J.D. Cuppett, S.E. Duncan, A.M. Dietrich, Evaluation of copper speciation and water quality factors that affect aqueous copper tasting response, *Chem. Senses* **31** (2006) 689–697.
- [69] S.-H. Li, J. Wang, M.-P. Zhao, Cupric ion enhanced molecular imprinting of bovine serum albumin in hydrogel, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 3359–3363.
- [70] S. He, M. Huang, W. Ye, D. Chen, S. He, L. Ding, Y. Yao, L. Wan, J. Xu, S. Miao, Conformational change of bovine serum albumin molecules at neutral pH in ultra-diluted aqueous solutions, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014) 12207–12214.
- [71] F.L.F. Gonzalez, V. Levi, Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy, *BAMBED* **31** (2003) 319–322.
- [72] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3533–3539.