



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANE EFFTING

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
POLÍMERO MAGNÉTICO MOLECULARMENTE IMPRESSO  
NO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO  
PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM LEITE**

LUCIANE EFFTING

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
POLÍMERO MAGNÉTICO MOLECULARMENTE IMPRESSO  
NO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO  
PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM LEITE**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.

Coorientador: Prof. Dr. Alesandro Bail.

Londrina  
2020

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

E27s      Effting, Luciane.  
Síntese, caracterização e aplicação de polímero magnético molecularmente impresso no desenvolvimento de um método de extração para determinação de colesterol em leite / Luciane Effting. - Londrina, 2020.  
114 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.  
Coorientador: Alesandro Bail.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Química - Tese. 2. Extração (Química) - Tese. 3. Magnetismo - Tese. 4. Alimentos. Teor de colesterol - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira. II. Bail, Alesandro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

LUCIANE EFFTING

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
POLÍMERO MAGNÉTICO MOLECULARMENTE IMPRESSO  
NO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO  
PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM LEITE**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>o</sup>. Felipe de Almeida La Porta  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Furtado da Silva  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

EFFTING, Luciane. **Síntese, caracterização e aplicação de polímero magnético molecularmente impresso no desenvolvimento de um método de extração para determinação de colesterol em leite**. 2020. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## Resumo

O nível elevado de colesterol no sangue é um grande causador de doenças coronarianas, sendo sua determinação em alimentos de relevância para a saúde humana. Alimentos de origem animal, tais como carnes, ovos e leite apresentam matrizes complexas, o que exige que um método de preparo de amostra seja executado antes da determinação de colesterol. Neste sentido, o uso de polímeros magnéticos molecularmente impressos é uma opção atraente para o preparo de amostra com o emprego da extração em fase sólida magnética, pois permite a retenção seletiva do analito na rede polimérica sobre o núcleo magnético e posterior eluição, executando a separação da fase extratora com o simples uso de um campo magnético. Esse trabalho teve o objetivo de sintetizar, caracterizar e avaliar o desempenho analítico em extração em fase sólida magnética de um polímero magnético molecularmente impresso na extração e quantificação de colesterol e sua aplicação em amostras de leite. Os materiais sintetizados, foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho módulo ATR-FTIR, obtendo-se bandas características dos materiais sintetizados, comprovando sua síntese. A análise de fisiossorção mostrou como as etapas de síntese influenciaram nos materiais, destacando-se a área superficial do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  (óxido de ferro com sílica - polímero molecularmente impresso) de  $163,18 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . A análise de raio-X e medidas de magnetização mostraram que o núcleo magnético de óxido de ferro permaneceu inalterado, proporcionando ao material bom desempenho magnético. A análise termogravimétrica apontou para a estabilidade do núcleo magnético e da sílica, com maior perda de massa para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , que apresentou maior quantidade de silício, evidenciando a presença da rede polimérica no material. As imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão mostraram o óxido de ferro dispersado na matriz de sílica, formando uma estrutura interpenetrante. O estudo do desempenho quanto à extração em fase sólida magnética apontou o clorofórmio como o melhor solvente em 60 segundos de agitação em Vortex, com uma massa de 10,0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , sendo necessários 0,5 mL de etanol para eluir o colesterol em um tempo de 180 segundos e capacidade máxima de sorção de  $314,05 \text{ mg g}^{-1}$ . Obteve-se o melhor ajuste para o modelo cinético de pseudo-segunda ordem e isoterma de sorção de Langmuir-Freundlich para dois sítios de sorção e a seletividade do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  frente a interferentes foi satisfatória. O desempenho analítico do método obteve um LQ e LD de 11,5 e  $38,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, com um fator de pré-concentração de 7,88 vezes e precisão, intra-dia e inter-dia, de 1,60% e 2,46% para concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , e 1,52% e 2,37% para concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A aplicação em amostras de leite bovino possibilitou a quantificação do colesterol, com recuperações acima de 90%.

**Palavras-chave:** método semi-covalente; extração em fase sólida magnética; magnetismo; amostras alimentícias.

EFFTING, Luciane. **Synthesis and characterization of molecularly imprinted magnetic polymer and application in the development of extraction methods for determination of cholesterol in milk.** 2020. 113 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

### Abstract

High blood cholesterol is a major cause of coronary heart disease and its determination in foods of relevance to human health. Animal foods such as meat, eggs and milk are considered complex matrices, which requires that a sample preparation method be performed prior to cholesterol determination. In this sense, the use of molecularly imprinted magnetic polymers is an attractive option for sample preparation with the use of magnetic solid phase extraction, as it allows selective retention of the analyte in the polymer network over the magnetic core and subsequent elution, performing separation of the extraction phase with the simple use of a magnetic field. Thus, this work aims to synthesize, characterize and evaluate the analytical performance in magnetic solid phase extraction of a magnetic molecularly imprinted polymer in the extraction and quantification of cholesterol and its application in milk samples. The synthesized materials were characterized by ATR-FTIR module infrared spectroscopy, obtaining characteristic bands of the synthesized materials, proving their synthesis. The physiosorption analysis showed how the synthesis steps influenced the materials, highlighting the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP (silica iron oxid - molecularly imprinted polymer) surface area of 163.18 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. X-ray analysis and magnetization measurements showed that the iron oxide magnetic core remained unchanged, providing the material with good magnetic performance. The thermogravimetric analysis pointed to the stability of the magnetic core and silica, with greater mass loss for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, which presented a greater amount of silicon, showing the presence of the polymeric network in the material. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy images showed the iron oxide dispersed in the silica matrix, forming an interpenetrating structure. The study of magnetic solid phase extraction performance indicated chloroform as the best solvent in 60 seconds of Vortex, with a mass of 10.0 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, requiring 0.5 mL of ethanol to elute the solvent cholesterol within 180 seconds and maximum sorption capacity of 314.05 mg g<sup>-1</sup>. The best fit for the pseudo-second order kinetic model and Langmuir-Freundlich sorption isotherm was obtained for two sorption sites and the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP selectivity against interferents was satisfactory. The best fit for the pseudo-second order kinetic model and Langmuir-Freundlich sorption isotherm was obtained for two sorption sites and the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP selectivity against interferents was satisfactory. The analytical performance of the method obtained an LQ 11.5 µg L<sup>-1</sup> an LD 38.5 µg L<sup>-1</sup>, respectively, with a preconcentration factor of 7.88 times and precision, intra- day and interday of 1.60% and 2.46% for a concentration of 5.0 mg L<sup>-1</sup>, and 1.52% and 2.37% for a concentration of 10.0 mg L<sup>-1</sup>. The application in bovine milk samples made it possible to quantify cholesterol, with recoveries above 90%.

**Key words:** semi-covalent synthesis; magnetic solid phase extraction; magnetism; food samples.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Pedro e Teresinha,  
por tornar isso possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, pela proteção e por nunca me deixarem sozinha, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Professor César Ricardo Teixeira Tarley, pela orientação e direcionamento durante o período do mestrado.

Ao meu coorientador, Professor Alesandro Bail e sua família, pela orientação e auxílio, desde 2013.

A Universidade Estadual de Londrina, ao programa de pós-graduação em Química e seu corpo docente e agências de fomento.

Aos meus pais, Pedro e Teresinha Effting, por me apoiar e incentivar nessa jornada e por ser um porto seguro para minha vida, apesar da distância. A minha irmã, Letícia Effting, por ser meu auxílio nos momentos difíceis.

Ao grupo de pesquisa LADEMA, em especial a Maiyara Prete, por toda ajuda e prestatividade. E aos grupos de pesquisa que dividem a rotina de laboratório, GMPC e LaEEM, pela parceria todos os dias.

Aos amigos que fiz durante esses dois anos de mestrado, Milena Prado, Maria de Almeida, Tulio Barreto, Beatriz Benuto, Érica Romagnoli, Beatriz Helena, Caroline Teixeira, Caroline Santana, Livia Ramazzoti, por tornarem os dias melhores, pelas conversas fiadas e pelas conversas sérias e por serem a melhor representação de um grupo de amigos que acolhe e cuida.

A minha amiga Caroline Meurer Reolon, por ser minha irmã do coração, ouvinte, conselheira, incentivadora e por me permitir fazer parte da vida do seu filho Héctor, mesmo à distância.

As amigadas que a vida me proporcionou ao longo desses anos, Ana Mandelli, Juliana Kreutz, Ana Caroline Meira, Luana de Sá, Thais Scopel e Franciele Fabricio, por serem presença constante, pelas conversas e pelo incentivo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do CHO.....	15
<b>Figura 2</b> - CHO esterificado.....	16
<b>Figura 3</b> - Representação do esquema de extração em fase sólida .....	19
<b>Figura 4</b> - Representação do esquema de extração em fase sólida magnética.....	21
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da produção de MIP .....	23
<b>Figura 6</b> - Esquema de síntese semi-covalente com espaçador sacrificial proposto pelos autores.....	29
<b>Figura 7</b> - (a) meio reacional do $Fe_3O_4$ e (b) meio reacional do $Fe_3O_4/SiO_2$ .....	47
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da síntese do material.....	48
<b>Figura 9</b> - (a) síntese do molde e monômero funcional, (b) polimerização na superfície do $F_3O_4/SiO_2$ e (c) remoção do molde .....	48
<b>Figura 10</b> - Estrutura do (3-aminopropil) trietoxissilano .....	49
<b>Figura 11</b> - Esquema da reação entre o monômero funcional e a molécula molde.....	54
<b>Figura 12</b> - Espectros de ATR da molécula molde (CHO), monômero funcional (ICPTES) e do complexo formado entre o CHO e o ICPTES .....	55
<b>Figura 13</b> - Espectros de ATR-FTIR do $Fe_3O_4$ e $Fe_3O_4/SiO_2$ .....	56
<b>Figura 14</b> - Espectros de ATR do $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ .....	57
<b>Figura 15</b> - Espectro de ATR do $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	58
<b>Figura 16</b> - Isotermas de adsorção e dessorção do $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4/SiO_2$ , $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ e $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	61
<b>Figura 17</b> - Curvas termogravimétricas para o $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4/SiO_2$ , $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ e $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	63
<b>Figura 18</b> - Curvas de magnetização do $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4/SiO_2$ e $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ . No detalhe, é possível observar a pequena histerese obtida para cada um deles.....	65
<b>Figura 19</b> - (a) campo magnético aproximado do $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ e (b) durante o processo de sorção.....	66
<b>Figura 20</b> - Difrátogramas de raios X para o $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4/SiO_2$ , $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ e $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	68

<b>Figura 21</b> - Micrografias eletrônica de transmissão para o $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	71
<b>Figura 22</b> - Micrografias eletrônicas para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .....	72
<b>Figura 23</b> - Micrografias eletrônicas para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .....	73
<b>Figura 24</b> - Micrografias eletrônicas para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ .....	74
<b>Figura 25</b> - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nas ampliações de 30000 e 90000 vezes .....	76
<b>Figura 26</b> - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nas ampliações de 30000 e 90000 vezes .....	77
<b>Figura 27</b> - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ nas ampliações de 30000 e 90000 vezes .....	78
<b>Figura 28</b> – Percentuais de sorção de CHO em diferentes solventes para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .....	79
<b>Figura 29</b> - Percentuais de adsorção de CHO comparando o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ . .....	81
<b>Figura 30</b> - Estudo da massa de adsorvente.....	82
<b>Figura 31</b> – Influência do tempo de contato entre 10,0 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ e 10,0 mL de solução de CHO 10,0 mg L <sup>-1</sup> no processo de sorção.....	83
<b>Figura 32</b> - Modelos de Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem, Elovich e Difusão Intrapartícula aplicados aos dados cinéticos para o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .....	85
<b>Figura 33</b> - Isoterma de sorção do CHO.....	86
<b>Figura 34</b> - Isoterma de sorção com aplicação do modelo linearizado de Langmuir .....	88
<b>Figura 35</b> - Isoterma de sorção com aplicação do modelo linearizado de Freundlich.....	88
<b>Figura 36</b> - Isoterma de sorção com aplicação do modelo de Langmuir- Freundlich para um sítio de sorção .....	89
<b>Figura 37</b> - Isoterma de sorção com aplicação do modelo de Langmuir- Freundlich para dois sítios de sorção.....	89
<b>Figura 38</b> - Fórmula estrutural do CHO (a) e dos interferentes escolhidos, 5- $\alpha$ -colestano (b), 7-dehidrocolesterol (c) e estradiol (d).....	90
<b>Figura 39</b> - Porcentagem de eluição de CHO para os solventes metanol, etanol e acetonitrila para 60, 120 e 180 segundos.....	93

<b>Figura 40</b> - Porcentagem de eluição de CHO com diferentes volumes de EtOH .....	94
<b>Figura 41</b> - Curva analítica para a etapa sem pré-concentração e com a etapa de pré-concentração .....	95
<b>Figura 42</b> - Cromatograma obtido na injeção de um padrão de CHO em CHCl <sub>3</sub> recuperado em fase móvel .....	99
<b>Figura 43</b> - Cromatograma obtido na injeção do extrato saponificado da amostra A recuperado em fase móvel.....	99
<b>Figura 44</b> - Cromatograma do extrato saponificado da marca A submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP.....	100
<b>Figura 45</b> - Cromatograma do extrato saponificado da marca B submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP.....	100
<b>Figura 46</b> - Cromatograma do extrato saponificado da marca C submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP.....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Área específica, volume de poro e diâmetro de poro para o $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ .....	59
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros magnéticos obtidos pela análise de medida magnética .....	65
<b>Tabela 3</b> - Elementos presentes no $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ .....	67
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros cinéticos preditos pelos modelos, para a adsorção de CHO pelo $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .....	84
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros preditos pelos modelos de isoterma para sorção de CHO em $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .....	87
<b>Tabela 6</b> - Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e 5- $\alpha$ -colestano .....	91
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e 7-deidrocolesterol .....	91
<b>Tabela 8</b> - Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e estradiol .....	91
<b>Tabela 9</b> - Comparação do método proposto com outros métodos de pré-concentração de CHO com determinação por HPLC-DAD .....	96
<b>Tabela 10</b> - Concentração de CHO encontrada em três diferentes marcas de leite UHT bovino .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional Vigilância Sanitária
CHO	Colesterol
dSPE	Extração em fase sólida dispersiva
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Óxido de ferro
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub>	Óxido de ferro com sílica
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP	Óxido de ferro com sílica - polímero molecularmente impresso
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /NIP	Óxido de ferro com sílica - polímero não impresso
GC	Cromatografia gasosa
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Diode Array ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido ( <i>Liquid-liquid Extraction</i> )
LQ	Limite de quantificação
MF	Monômero funcional
MIP	Polímeros molecularmente impressos ( <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> )
MSPE	Extração em fase sólida magnética
NIP	Polímero não impresso ( <i>Non Imprinted Polymer</i> )
SPE	Extração em fase sólida
TEOS	Tetraetoxisilano
UHT	Ultra High Temperature (temperatura ultra alta)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1	COLESTEROL: IMPORTÂNCIA NA SAÚDE HUMANA.....	14
2.2	QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS .....	17
2.3	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS .....	22
2.4	MATERIAIS MAGNÉTICOS .....	30
2.5	SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO MAGNÉTICO .....	32
2.6	ESTUDO DE CINÉTICA DE SORÇÃO .....	36
2.7	ESTUDOS DE ISOTERMAS DE SORÇÃO .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	42
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	43
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	43
4.2	EQUIPAMENTOS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA DISPERSIVA E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....	43
4.2.1	Determinação por Cromatografia Líquida .....	43
4.2.2	Caracterização dos Materiais Sintetizados .....	44
4.3	PROCEDIMENTO DE SÍNTESE DO MATERIAL.....	45
4.3.1	Síntese do Óxido de Ferro ( $Fe_3O_4$ ) .....	45
4.3.2	Proteção do Óxido de Ferro com Sílica ( $Fe_3O_4/SiO_2$ ) .....	46
4.3.3	Polimerização do MIP na Superfície do Óxido de Ferro com Sílica ( $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ ).....	47
4.3.4	Síntese do $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	48
4.4	ESTUDOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA DISPERSIVA.....	49
4.4.1	Estudo do Meio Extrator para CHO pelo $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ e Comparação com o $Fe_3O_4/SiO_2/NIP$ .....	49
4.4.2	Otimização do Tempo de Agitação e Estudo Cinético .....	49
4.4.3	Influência da Massa de $Fe_3O_4/SiO_2/MIP$ na Extração de CHO .....	50

4.4.4	Construção das Isotermas de Adsorção .....	50
4.4.5	Influência do Solvente de Eluição .....	50
4.4.6	Avaliação da Seletividade do Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP para CHO .....	51
4.4.7	Determinação dos Parâmetros Analíticos .....	52
4.4.8	Aplicação do Método Proposto em Amostras Reais .....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS .....	54
5.1.1	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR) .....	54
5.1.2	Fisiossorção de Gás N <sub>2</sub> .....	59
5.1.3	Análise Termogravimétrica.....	62
5.1.4	Medidas de Magnetização .....	64
5.1.5	Fluorescência de Raios X .....	67
5.1.6	Difração de Raios X .....	68
5.1.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	69
5.1.8	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	75
5.2	ESTUDOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA.....	79
5.2.1	Estudo do Meio Extrator para CHO pelo Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP e Comparação com o Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /NIP .....	79
5.2.2	Influência da Massa de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP na Extração de CHO .....	81
5.2.3	Otimização do Tempo de Agitação e Estudo Cinético .....	82
5.2.4	Construção das Isotermas de Sorção .....	85
5.2.5	Avaliação da Seletividade do Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP para CHO .....	90
5.2.6	Influência do Solvente de Eluição .....	92
5.2.7	Determinação dos Parâmetros Analíticos .....	94
5.2.8	Aplicação do Método Proposto em Amostras Reais .....	97
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Causa principal das doenças cardíacas, o colesterol (CHO) tem papel fundamental no corpo humano, sendo precursor na síntese de outros compostos importantes à saúde humana e com atividade dentro das membranas celulares. A principal fonte de CHO ao organismo é endógena, sintetizada pelo próprio fígado. Presente nos alimentos de origem animal, fonte exógena, leites, carnes e ovos e seus derivados, onde sua quantificação é de extrema importância para a saúde humana devido ao alto consumo desses alimentos e um desafio do ponto de vista químico (POLYAKOVA et al., 2016).

Por esse motivo, o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação do CHO nos alimentos é objeto de estudo a algum tempo e a principal dificuldade é à complexidade da matriz em que se encontram. Matrizes alimentares costumam ser heterogêneas, de composição variada e compostos potencialmente interferentes (proteínas, vitaminas, ácidos graxos insaturados) que dificultam a quantificação direta do CHO por cromatografia, técnica tradicionalmente utilizada, necessitando de uma etapa de preparo de amostra (LI et al., 2019).

Esse preparo da amostra geralmente inicia pela saponificação das gorduras presentes na matriz em análise, a fim de separá-las dos demais constituintes. Com a obtenção do extrato saponificado, o CHO precisa ser isolado das demais gorduras para ser quantificado (SPELTINI et al., 2017).

Entre os métodos disponíveis para o isolamento do CHO, a extração em fase sólida é a mais relatada, consistindo em empacotar a fase sólida em uma coluna e o percolamento da solução com o analito a ser isolado. Diversos materiais sorventes são relatados para esse fim, porém a maioria deles sofre com a falta de seletividade ao analito de interesse, além do uso de grandes quantidades do material sorvente e de solventes orgânicos nas etapas de lavagem e eluição (ÖTLES e KARTAL, 2016).

Para superar a falta de seletividade, a opção é o uso de polímeros molecularmente impressos (MIPs). Esses materiais são capazes de incorporar locais de reconhecimento de substratos, sendo o reconhecimento molecular conferido pelo próprio analito de interesse, que após ser removido da matriz polimérica, produz sítios de ligação com tamanho e forma semelhantes a sua estrutura (WANG et al., 2016).

A principal vantagem desse material é a presença desses sítios de reconhecimento personalizados no material sintetizado. Ainda, possuem alta

estabilidade em uma ampla gama de condições (temperatura, pressão, solventes, pH da solução) e baixo custo. Contudo, certas limitações do material ainda dificultam sua aplicabilidade, como a cinética de ligação lenta, incompatibilidade aquosa e heterogeneidade da distribuição do sítio de ligação para sínteses em *bulk* (DENG e WANG, 2014).

A fim de superar essas desvantagens, novas rotas de síntese passaram a ser estudadas, dentre elas, a síntese do MIP em um sólido suporte. Em 1998, Ansell e Mosbach relataram o primeiro uso de um polímero molecularmente impresso magnético, em que o um MIP para (S)-propranolol foi polimerizado na superfície do óxido de ferro e desde então, esse tipo de material é aplicado em amostras ambientais, alimentícias e biológicas (BEDWELL e WHITCOMBE, 2016).

Essa abordagem de síntese proporciona ao material final, maior área de superfície por volume, tornando as cavidades impressas mais acessíveis ao analito e facilitando o processo de sorção (ASHLEY et al., 2017).

Ainda, o MIP com propriedades magnéticas pode ser empregado como adsorvente para a extração em fase sólida magnética. Nessa técnica, a fase sólida com propriedades magnéticas é dispersada na fase líquida e agitada vigorosamente com auxílio de agitadores mecânicos, tornando a difusão do analito da solução para a fase sólida mais rápida. Além disso, a etapa de separação entre a fase sólida e a fase líquida é facilitada com a aplicação de um campo magnético externo que atrai a fase sólida, simplificando as etapas de filtração e centrifugação (ANSARI e KARIMI, 2017).

Dessa forma, polímeros molecularmente impressos magnéticos são uma ferramenta interessante para a aplicação em separação e análise de analitos em amostras complexas, devido a sua área superficial, tamanho de partícula, seletividade para as moléculas alvo e magnetismo. Sua aplicação em amostras complexas abre uma nova perspectiva para análise de compostos importantes nessas matrizes (KHAN et al., 2018) e o presente trabalho descreve a síntese, caracterização e aplicação de um polímero molecularmente impresso magnético na extração em fase sólida magnética de colesterol, objetivando a determinação desse analito em amostras de leite.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 COLESTEROL: IMPORTÂNCIA NA SAÚDE HUMANA

As doenças cardiovasculares são causadoras de aproximadamente, uma em cada quatro mortes que ocorrem no mundo, devido a complicações de doenças como a angina do peito, acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão arterial, arritmia, ataque cardíaco, insuficiência cardíaca, aterosclerose, entre outras. Existem alguns fatores de risco que aumentam consideravelmente a chance de um indivíduo desenvolver uma doença coronariana, destacando-se a idade (45 anos ou mais para homens; 55 anos ou mais para mulheres), histórico familiar de doença cardíaca precoce, consumo de cigarro, pressão arterial alta, sobrepeso ou obesidade, inatividade física, níveis de diabetes e colesterol acima do recomendado (BLESSO e FERNANDEZ, 2018).

Dentre os fatores de risco acima citados, a hipótese de que o CHO ingerido na dieta contribui para o risco de doença cardíaca surgiu no fim da década de 1960, conforme relatos da literatura. Anos mais tarde, a American Heart Association (Associação Americana do Coração), entidade americana sem fins lucrativos, passou a recomendar cuidados no sentido de reduzir as mortes causadas por doenças cardiovasculares, como limitar a ingestão de CHO em 300,0 mg por dia para indivíduos saudáveis (DIETSCHY e SIPERSTEIN, 1967; SOLIMAN, 2018).

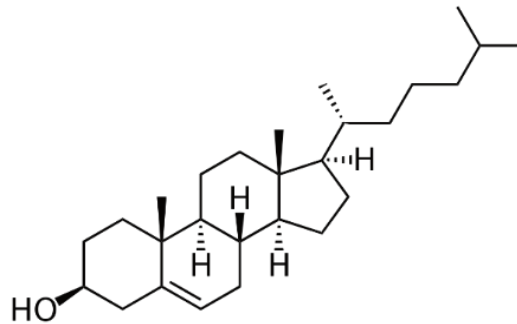
No entanto, não há um consenso sobre qual a quantidade exata de CHO deve ser consumida diariamente e, as Diretrizes Alimentares referentes aos anos 2015 a 2020 para os americanos, removeram a recomendação de um limite máximo de 300,0 mg diários, porém, ainda mantem a orientação de comer o mínimo possível de CHO dietético e a manutenção de um padrão alimentar saudável (SOLIMAN, 2018).

No Brasil, o Guia Alimentar para a População Brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014) também não apresenta uma recomendação do valor máximo de CHO a ser ingerido diariamente, apenas faz orientações a respeito do consumo moderado de alimentos ricos em CHO e recomendam a escolha de uma alimentação saudável.

Do ponto de vista químico, o CHO é pertencente a classe dos esteróides, também conhecidos como esteróides alcoólicos. Esses compostos possuem uma estrutura básica de dezessete átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si, com ramificações que podem totalizar de 27 a 29 carbonos (TOIVO et al., 2001). A

estrutura da molécula de CHO (Figura 1) é composta de um esqueleto de anel fundido tetracíclico (região hidrofóbica), um grupo hidroxila (região hidrofílica) no carbono 3, uma ligação dupla entre carbono 5 e 6 e uma cadeia lateral de hidrocarboneto iso-octil no carbono 17. Sua massa molecular é  $386,35 \text{ g mol}^{-1}$  e sua fórmula molecular é representada por  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$  (LI et al., 2019).

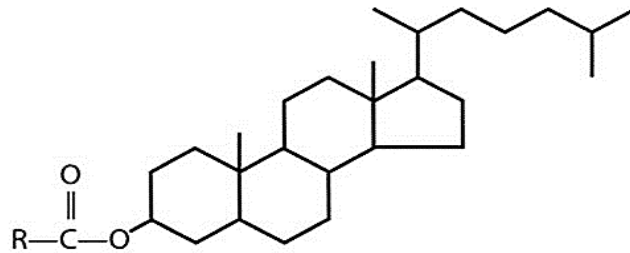
**Figura 1** - Estrutura química do CHO



**Fonte:** adaptada de LI et al., 2019

Apesar dos problemas mencionados anteriormente, o CHO é essencial para diversas funções celulares, principalmente na construção, manutenção e fluidez das membranas nas diferentes temperaturas fisiológicas. Ainda, é a molécula precursora para a síntese de vitamina D e de hormônios esteróides, incluindo a glândula adrenal dos hormônios cortisol e aldosterona e os hormônios sexuais progesterona, estrogênios e testosterona, assim como seus derivados, essenciais no processo de reprodução humana (HU, ZHENG e WANG, 2010; SOLIMAN, 2018).

No corpo humano, o CHO compreende cerca de 0,2% do peso corporal normal. A maior parte está no cérebro e no sistema nervoso, onde a sua função ainda não é totalmente conhecida. Outra parte, está nos músculos, onde é um componente estrutural, na forma de CHO livre ou esterificado no grupo hidroxila, com ácidos graxos de diferentes cadeias e saturações (Figura 2), representando uma função de armazenamento de energia (HANSEN e WANG, 2015)

**Figura 2 - CHO esterificado**

**Fonte:** adaptado de TOIVO et al., 2001

No corpo humano, o CHO é transportado por lipoproteínas, agregados moleculares responsáveis pelo transporte dos esteróides em meios líquidos, já que eles não se misturam facilmente com o plasma sanguíneo. São dois os tipos principais: lipoproteína de baixa densidade (*LDL - Low Density Lipoproteins*) e lipoproteína de alta densidade (*HDL - High Density Lipoproteins*). A lipoproteína de baixa densidade, é chamada popularmente de CHO “ruim”, porque transporta-o aos tecidos, incluindo as artérias. A maior parte do CHO no sangue é a forma de LDL e quanto maior esse nível, maior o risco de doença cardíaca. Já a lipoproteína de alta densidade, é chamada de CHO “bom”, porque leva-o dos tecidos para o fígado, que o remove do corpo, porém, um baixo nível de CHO HDL também aumenta o risco de doença cardíaca (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2010).

Se houver excesso de CHO no sangue, parte pode ficar preso nas paredes das artérias e com o tempo, o acúmulo pode formar uma placa, estreitando as artérias e tornando-as menos flexíveis, causando o “endurecimento das artérias”, processo que pode acontecer com os vasos sanguíneos em qualquer parte do corpo, incluindo os do coração. Se as artérias coronárias ficarem parcialmente bloqueadas pela placa, o sangue pode não ser capaz de trazer oxigênio e nutrientes suficientes para o músculo cardíaco, causando as complicações citadas anteriormente (DIETSCHY e SIPERSTEIN, 1967; LANGSTED e NORDESTGAARD, 2019).

A concentração de CHO total, ocorrendo na forma livre e como ésteres de CHO no soro humano é altamente variável entre os indivíduos. Os níveis ideais de CHO para um adulto saudável são: CHO total abaixo de 200,0 mg dL<sup>-1</sup>, LDL-colesterol (colesterol “ruim”) abaixo de 130,0 mg dL<sup>-1</sup> e HDL-colesterol (colesterol “bom”) acima de 40,0 mg dL<sup>-1</sup> para homens e acima de 50,0 mg/dL para mulheres (BRASIL, 2014).

O método padrão de referência para a medição do CHO total no sangue é chamado de Abell-Kendall modificado. É um método químico clássico, em várias etapas, que envolve a saponificação de ésteres de colesterol por hidróxido, a extração com hexano e o desenvolvimento de cor com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado (LI et al., 2019).

A introdução de CHO no metabolismo ocorre por meio da sua síntese pelo fígado (endógeno) e 20,0 a 25,0% é proveniente da dieta alimentar (exógeno). Pesquisas apontam que o aumento do consumo de CHO dietético está associado à diminuição da síntese de CHO pelo fígado, possivelmente como um mecanismo compensatório que mantém o nível total do CHO constante (LANGSTED e NORDESTGAARD, 2019).

As principais fontes de CHO na dieta são produtos de origem animal, ovos, leite e carnes. Nos alimentos, o CHO ocorre como esteróis alcoólicos livres ou como ésteres de colesteril. A informação nutricional sobre o conteúdo de CHO nos alimentos é relevante, uma vez que a sobrecarga pode aumentar drasticamente os níveis de CHO plasmático e, conseqüentemente, os riscos para a saúde (CORTÉS-HERRERA et al., 2018).

## 2.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

A determinação do teor de CHO nos alimentos é de primordial importância para selecionar uma dieta com baixa ingestão de CHO e impulsiona o desenvolvimento de técnicas para sua quantificação (LI et al., 2019). O CHO pode ser determinado por várias técnicas analíticas, tais como, gravimetria, colorimetria, fluorimetria e cromatografia, sendo essa a técnica mais comumente utilizada (ALBUQUERQUE et al., 2016). Na literatura, vários trabalhos relatam o uso da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (KARDANI, MIRZAJANI e RAMEZANI, 2018; CLAUSEN, PIRES E TARLEY, 2014; DANESHFAR, KHEZELI e LOTFI, 2009; PUOCI et al., 2008; FENTON, 1992) e de cromatografia a gás (GC) (FLETOURIS et al., 2010; HWANG e LEE, 2002; LUZÓN-TORO, ZAFRA-GÓMEZ e BALLESTEROS, 2007) para a determinação de CHO em amostras alimentícias. Ainda, a detecção de CHO é relatada com o uso de medidas eletroanalíticas por voltametria cíclica (ANIRUDHAN, DEEPA e BINUSSREEJAYAN, 2018).

Matrizes complexas, como é o caso dos alimentos, podem tornar difícil a tarefa de quantificação do CHO, requerendo etapas anteriores a injeção em equipamentos de detecção, como limpeza de amostras e métodos intensivos de pré-tratamento. A abordagem mais comum envolve a extração da fração lipídica total seguida de hidrólise alcalina (saponificação), remoção da matéria não saponificável, limpeza do extrato, possível derivatização dos esteróis e separação, para enfim proceder com a quantificação. Porém, possui um tempo de operação longo e faz uso de uma quantidade considerável de solventes orgânicos caros e prejudiciais ao meio ambiente (NEZHADALI, ES'HAGHI e KHATIBI, 2017).

A matriz alimentar é complexa e não homogênea, sua forma física pode variar entre sólido e líquido com origem natural ou processada. Apesar de técnicas avançadas, o isolamento de um componente alimentar em um alimento, constituído de enorme quantidade de substâncias químicas e eliminação de possíveis erros durante a determinação do analito, ainda é um objetivo difícil para os pesquisadores (ÖTLES e KARTAL, 2016).

Após a coleta da amostra, a etapa de preparação antes da detecção e as etapas de quantificação para os analitos ocupam a maior parte do tempo total da análise e geralmente tem uma contribuição significativa para o custo total. A dissolução completa da amostra, a remoção de potenciais interferentes, a separação dos analitos desejados da amostra e a sua concentração, devido aos limites de detecção, são os princípios básicos de um procedimento de preparação bem-sucedido. Também, reduzir o tempo de análise, diminuir a quantidade de solvente orgânico utilizado para a extração e evitar a contaminação da amostra são os outros desafios importantes na análise de alimentos (ÖTLES e KARTAL, 2016).

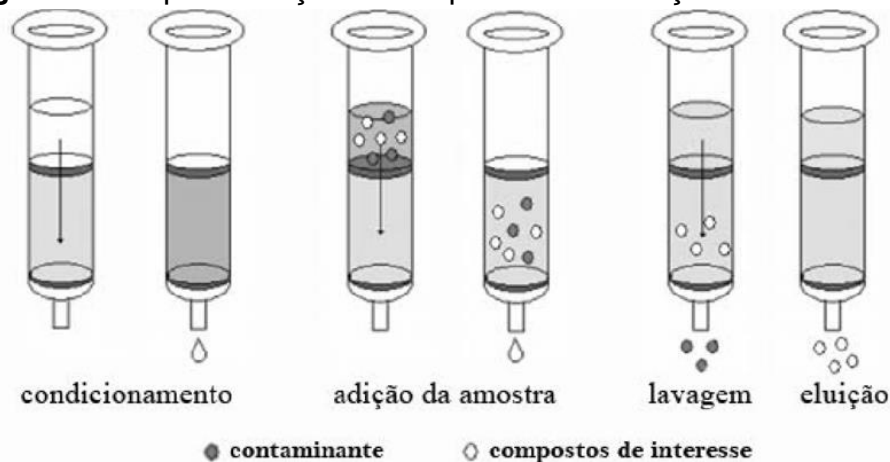
Na literatura, estão descritas o uso de algumas técnicas para a extração do CHO. A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) pode ser uma alternativa para as etapas de extração e limpeza na preparação da amostra, com as vantagens de se obter um alto fator de enriquecimento, alta recuperação de extração e simplicidade de operação. Porém, todo o processo de extração é manual e a centrifugação limita o volume de amostra a ser utilizado, demanda maior tempo no processo e dificultando a automação da técnica. Esse método foi utilizado por Daneshfar, Khezeli e Lotfi (2009) na extração de CHO.

Uma alternativa para a quantificação do CHO é a extração em fase sólida (SPE), empregada, por exemplo, nos trabalhos de Clausen, Visentainer e Tarley

(2014); Shi et al., (2006); Puoci et al., (2008), com a finalidade a remoção de interferentes da matriz da amostra e a concentração e o isolamento do analito de interesse. Dentre as vantagens em relação a outros métodos de extração, cita-se o menor consumo de solvente orgânico e assim o volume reduzido de resíduos tóxicos, facilidade de automação, regeneração da fase sólida e capacidade seletiva. A SPE envolve o particionamento do analito entre duas fases, a fase líquida (matriz da amostra) e uma fase sólida (adsorvente) (AZZOUZ et al., 2018).

A forma tradicional de SPE (Figura 3) utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 50,0 e 1000,0 mg de sorvente empacotado, com operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e a vazão dos solventes. Quando automatizada, requer manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável (RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017).

**Figura 3** - Representação do esquema de extração em fase sólida



Fonte: adaptado de LANÇAS, 2008

Nos últimos anos, diferentes materiais foram utilizados como adsorventes em fase sólida, como nanotubos de carbono, sílicas modificadas, MOFs (Metal Organic Framework), MIPs (Polímeros Molecularmente Impressos), polímeros revestidos ou enxertados, HDLs (Hidróxido Duplo Lamelar), nanopartículas e aerogéis de dióxido de Titânio, entre outros (AHMADI et al., 2017).

Apesar das vantagens da SPE, o empacotamento do material dentro das colunas pode dificultar o processo de difusão do analito da fase líquida para a fase sólida, necessitando de quantidades superiores de sorvente e solvente. A fim de superar essa

desvantagem, passou-se a dispersar o sorvente na fase líquida e agitá-lo mecanicamente usando agitação magnética, vórtex ou ultra-som, facilitando o processo de sorção. Essa técnica é conhecida como extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), com baixo custo de operação e baixo consumo de solvente em comparação com a SPE tradicional, devido ao sorvente interagir diretamente com os analitos e ser separado da solução geralmente usando centrifugação, para em seguida, ser realizada a dessorção usando um eluente adequado (MALIK et al., 2019).

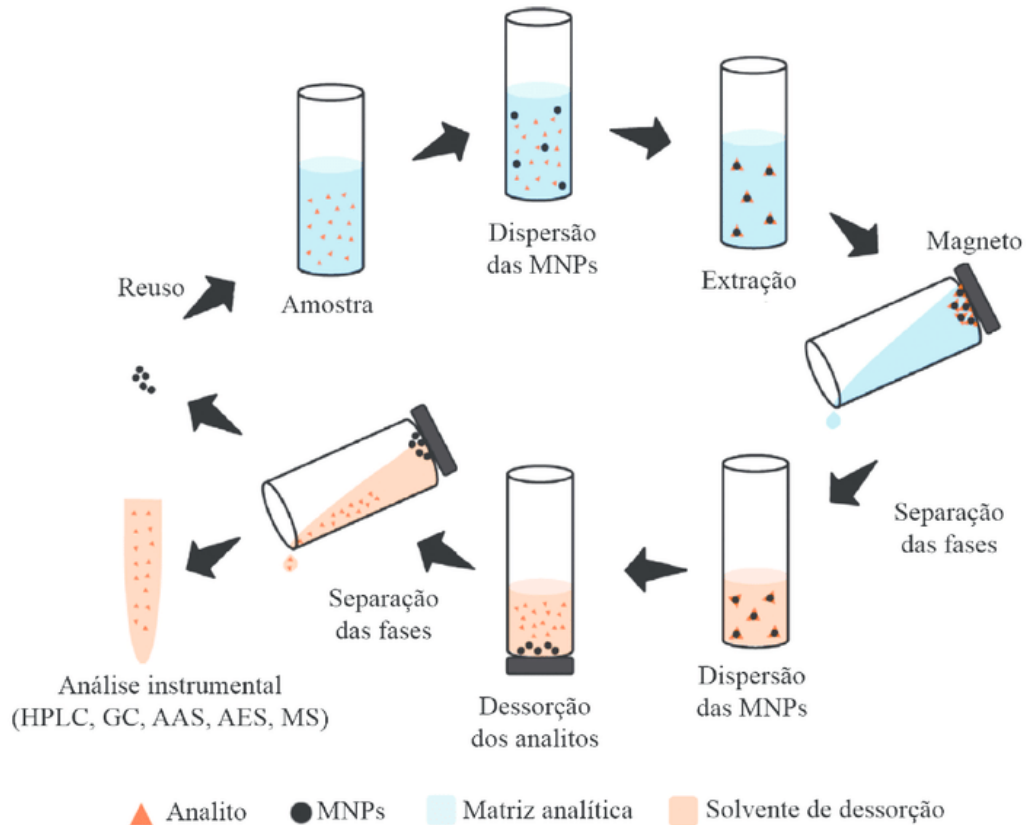
Os mesmos adsorventes citados na extração em fase sólida podem ser aqui utilizados e o trabalho relatado por Ahn et al., (2012) fez uso dessa técnica na extração de CHO. Porém, há a dificuldade de isolar a fase sólida da fase líquida, necessitando de centrifugação e filtração, aumentando o tempo de operação final (SPELTINI et al., 2017).

Para facilitar a separação entre as fases, a extração em fase sólida magnética (MSPE) é uma técnica de pré-tratamento de amostras, com as vantagens de separação das fases com a aplicação de um campo magnético externo, economia de tempo, facilidade de operação, menor quantidade de sorvente, baixo consumo para solventes orgânicos tóxicos em comparação com a SPE tradicional e conseqüentemente, menor custo de operação. Fase sólida e fase líquida são adicionadas em tubos e levadas a agitação, distribuindo uniformemente o sorvente, que interage igualmente com a matriz e facilita o processo de concentração do analito. O sorvente é separado com a aplicação de um campo magnético externo e uma alíquota da fase líquida é retirada para análise (ANSARI, 2017).

A extração em fase sólida magnética exibe vantagens como uma rápida difusão do analito da solução para o adsorvente, alta relação entre área, espaço e volume, reutilização do material adsorvente, pré-concentração seletiva do analito de interesse e consumo mínimo de solventes orgânicos em comparação com a extração em fase sólida tradicional (ANSARI e KARIMI, 2017).

Uma representação desse método de extração é apresentada na Figura 4.

**Figura 4** - Representação do esquema de extração em fase sólida magnética



**Fonte:** Adaptado de Speltini et al., 2017

Uma gama de sorventes está disponível para as técnicas de extração em fase sólida descritas anteriormente e a seleção deve ser feita de acordo com a matriz alimentar, os analitos de interesse e as substâncias interferentes. A sílica é o sorvente mais comum devido à sua adequação para modificação e estabilidade, além de ser um sorvente vendido comercialmente. Exemplos típicos são: sílica ligada com cadeias não polares como C<sub>18</sub> (octadecil), C<sub>8</sub> (octilo), grupos ciclohexil ou cadeias polares, tais como grupos hidroxilo, ciano e diol, ou, resinas poliméricas, Florisil, sorventes polares (alumina, carvão) e ácido carboxílico ou grupos amínicos ligados à sílica para a obtenção de grupos funcionais iônicos. Porém, esses materiais não apresentam seletividade ao analito de interesse, fator importante em algumas extrações (AZZOUZ et al., 2018).

Os polímeros molecularmente impressos (MIP) ganharam popularidade por oferecer uma maior seletividade ao composto alvo, permitindo a concentração do analito, remoção das substâncias interferentes da matriz da amostra e posterior eluição para a determinação analítica (SONG et al., 2014).

### 2.3 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

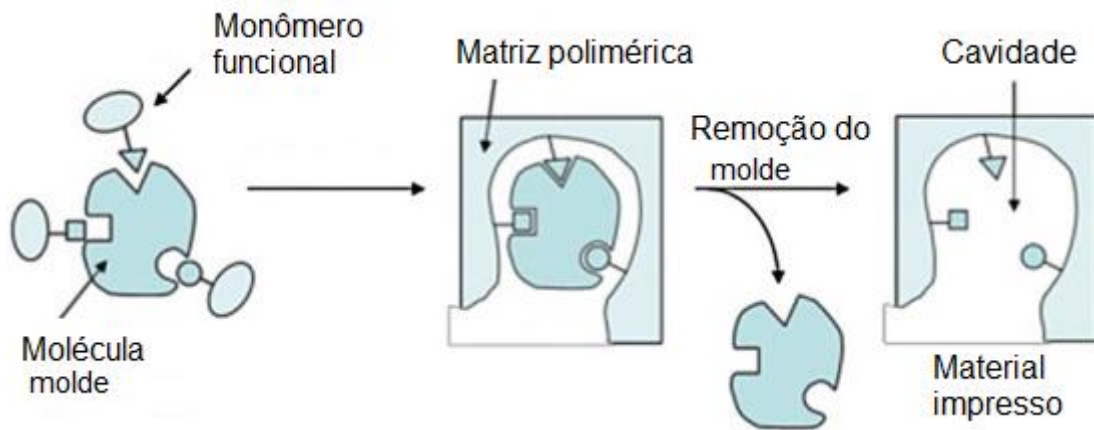
Os polímeros molecularmente impressos são materiais úteis para incorporar locais de reconhecimento de substratos, sendo o reconhecimento molecular atribuído aos sítios de ligação com tamanho, forma e ligação conferida pelo próprio analito de interesse (LI e ROW, 2018).

Na impressão molecular, ocorre a formação de complexos de interação entre a molécula de interesse (analito) e os monômeros funcionais, na presença de um agente de reticulação e de um solvente porogênico (CHEN et al., 2016). Após a polimerização, a molécula molde é extraída e os sítios de ligação com forma, tamanho e funcionalidades complementares ao analito alvo são criados. O MIP resultante é quimicamente estável, robusto e resistente a uma ampla faixa de pH, solventes e temperatura. A capacidade de reconhecimento molecular do polímero molecularmente impresso é investigada em relação ao polímero não impresso (NIP, *Non Imprinted Polymer*). Este material é sintetizado nas mesmas condições do MIP, com exceção da adição do molde, funcionando como um polímero controle (CHEN et al., 2016; MARTÍN-ESTEBAN, 2013; MALITESTA et al., 2012).

O primeiro uso de MIP foi relatado somente em 1972, por Wulf e Ali Sarhan, descrevendo a síntese de um polímero com sítios seletivos para separação enantiomérica de racematos de açúcares. Em 1983, Vlatakis e colaboradores publicaram um documento que levou à aplicação generalizada de MIP em campos diferentes. Mas foi a partir de 1993 que observou-se um grande número de publicações sobre o uso desse material (SZATKOWSKA et al., 2013; BELTRAN et al., 2010; MAYES e WHITCOMBE, 2005; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005).

Nos últimos anos, a produção de polímeros molecularmente impressos foi aprimorada e pode-se encontrar uma ampla literatura publicada sobre o material, sua aplicação, métodos de síntese e escolha dos reagentes. A aplicação do material sintetizado é fator importante a ser considerado e a escolha dos reagentes adequados é essencial para a obtenção de um material com as propriedades desejadas (CHEN et al., 2016). A Figura 5 apresenta uma representação esquemática da produção de MIP.

**Figura 5** - Representação esquemática da produção de MIP



**Fonte:** Adaptado de Ansari (2017)

Uma molécula molde é indispensável na técnica de impressão molecular. O analito alvo é geralmente selecionado como a molécula molde, desempenhando um papel importante no processo de impressão molecular (DENG e WANG, 2014). Esse molde, para ser considerado ideal, deve atender aos seguintes requisitos: ser quimicamente inerte, ter um grupo funcional adequado que possa interagir com o monômero funcional selecionado e ser estável sob as condições de polimerização (por exemplo: alta temperatura e irradiação UV) (CHEN et al., 2016; YAN e KYUNG, 2006).

A remoção do molde após a polimerização também é um fator crítico na escolha dos analito. Para facilitar a remoção do molde, o polímero impresso geralmente é lavado com soluções de caráter ácido ou básico, ou uma mistura de solventes. Em alguns casos, pode ser necessário o aquecimento da solução de lavagem para remoção do molde e o emprego de mais de uma etapa de lavagem (SCHIRHAGL, 2014).

O papel do monômero funcional (MF) é de fornecer grupos funcionais para o reconhecimento específico ao polímero, por meio das interações entre a molécula molde e o monômero funcional. Assim, um monômero funcional ideal deve ser favorável à formação de um complexo e complementar às propriedades químicas e à geometria da molécula molde (CHEN et al., 2016; DENG e WANG, 2014).

É muito importante associar a funcionalidade do molde à funcionalidade do monômero funcional de uma forma complementar, por exemplo, doador de ligação de hidrogênio com o aceitador de ligação de hidrogênio, para maximizar a formação do complexo e, assim, o efeito de impressão. Em geral, um monômero funcional ácido é selecionado para a preparação de MIP para um analito básico, e um monômero

funcional básico para um alvo ácido. Em alguns casos, a combinação de monômeros funcionais ácidos e básicos é mais eficiente no efeito de impressão do que um único tipo de monômero funcional, devendo-se atentar a reatividade dos monômeros para assegurar que a copolimerização seja viável (LI e ROW, 2018; CORMACK e ELORZA, 2004).

No processo de polimerização, um agente de ligação cruzada é usado para fixar monômeros funcionais em torno das moléculas molde, formando assim um polímero rígido altamente reticulado, mesmo após a remoção do molde. O tipo e a quantidade desse reagente, tem influência na seletividade e na capacidade de ligação do MIP. Geralmente, uma quantidade muito pequena resultará em propriedades mecânicas instáveis devido ao baixo grau de reticulação e, uma quantidade grande reduzirá o número de sítios de reconhecimento (CHEN et al., 2016).

Os solventes porogênicos atuam como meios de dispersão e agentes formadores de poros no processo de polimerização, desempenhando um papel importante na polimerização. A polaridade do solvente pode afetar a interação entre a molécula molde e o monômero funcional e, portanto, as propriedades de adsorção do MIP, especialmente em sistemas de interação não covalentes (SPELTINI et al., 2017).

O primeiro polímero molecularmente impresso para a molécula de CHO é descrito por Whitcombe e colaboradores (1995), com uma abordagem diferenciada para a introdução da funcionalidade do sítio de reconhecimento. A metodologia baseava-se na utilização do éster 4-vinilfenilcarbonato funcionando como um molde ligado covalentemente ao monômero funcional etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA). Essa ligação é facilmente clivada por hidrólise básica, com a perda de CO<sub>2</sub>, resultando na formação de um sítio de reconhecimento não covalente, contendo um resíduo fenólico, capaz de interagir com o CHO através de ligações de hidrogênio. Os autores verificaram que os polímeros obtidos por este método se ligam ao CHO com uma única constante de dissociação, exibindo assim características semelhantes a um receptor biológico ou hospedeiro sintético. A capacidade máxima de adsorção obtida foi 1,14 mol g<sup>-1</sup>.

Hwang e Lee (2002), avaliaram polímeros impressos de CHO por polimerização em bulk covalente e não covalente. A impressão covalente envolvia a utilização do molde 4-vinilfenilcarbonato, enquanto a não covalente utilizava diferentes monômeros funcionais (ácido metacrílico ou 4-vinilpiridina) com a molécula de CHO. Os materiais foram empacotados em colunas e todos separaram o CHO de outros esteroides e

verificou-se que a capacidade de adsorção dependia significativamente do uso de monômeros funcionais, alcançando uma capacidade de sorção de  $3,5 \text{ mg g}^{-1}$  para o polímero impresso covalentemente,  $4,0 \text{ mg g}^{-1}$  com o monômero funcional 4-vinilpiridina e  $3,1 \text{ mg g}^{-1}$  com o monômero funcional ácido metacrílico. Os autores sugeriram que o polímero covalentemente impresso tem potencial para análise quantitativa.

Puoci e colaboradores (2007) obtiveram um sorvente para extração em fase sólida de CHO em matrizes de alimentos, que segundo os autores, superava as limitações dos métodos tradicionais de detecção, que requerem pré-tratamentos das amostras, como a saponificação e a extração com solventes orgânicos. Neste estudo, três proporções de ácido metacrílico (monômero funcional) e dimetacrilato de etilenoglicol (agente de reticulação) foram estudadas, devido a diferentes características hidrofílicas que estes reagentes provem ao material. Para os autores, o material apresenta seletividade ao CHO frente a interferentes (progesterona e hidrocortisona) e os materiais podem ser utilizados com sucesso para a determinação de CHO em amostras de queijo.

Gupta e Kumar (2011) apresentaram polímeros híbridos sol-gel obtidos em meio reacional aquoso e meio reacional orgânico. A porcentagem de adsorção ou religação foi maior para o polímero derivado de fenil-trietoxissilano (PhTEOS), sintetizado pelo método sol-gel em pH ácido. Para os autores, vários fatores afetam a religação das moléculas molde e o estudo forneceu informações sobre a impressão molecular do CHO em matriz sol-gel, destacando a importância da caracterização dos materiais antes de aplicá-los.

Polyakova e colaboradores (2016) apresentaram novos polímeros orgânico-inorgânico utilizando metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) e dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) como co-monômeros, preparados por co-polimerização na superfície de nanopartículas de celulose e estabilizadas com poli(vinil pirrolidona) (PVP) em diferentes concentrações de CHO como molécula molde. Os estudos de adsorção revelaram que as capacidades máximas de adsorção aumentaram para o material sintetizado na concentração mais alta de CHO.

Inanan e colaboradores (2016) estudaram nanoesferas poliméricas impressas com CHO preparando um complexo de pré-polimerização com CHO como molde e éster metílico de N-metacrilóil amido-(l)-fenilalanina (MAPA) como monômero funcional. Os estudos de competição de adsorção com análogos de CHO, estrona,

estradiol, testosterona e progesterona apresentaram coeficientes de seletividade relativos 10,4 vezes maiores quando comparados as nanoesferas poliméricas não impressas.

O emprego de MIP no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para colesterol também tem sido reportado. Chou e Liu (2005), desenvolveram um sensor eletroquímico usando um polímero molecularmente impresso para colesterol. A reação redox ferri-ferro foi usada como meio de quantificar o colesterol. Este sensor eletroquímico empregou um eletrodo de ouro modificado, um eletrodo contador de platina e um eletrodo de referência Ag/AgCl (prata/cloreto de prata) e o alcanotiol para formar o filme no eletrodo de trabalho de ouro. Segundo os resultados obtidos pelos autores, este protótipo de sensor poderia detectar concentrações de colesterol entre 66,0 e 700,0 nM utilizando apenas um 1,0  $\mu\text{L}$  de volume de amostra.

Em trabalho desenvolvido anteriormente no grupo de pesquisa, Clausen e colaboradores (2014), descreveram a síntese de polímeros molecularmente impressos com diferentes proporções de poli (ácido metacrílico) (MAA) e tetraetoxisilano (TEOS) e relatam seu desempenho na capacidade de adsorção e seletividade para CHO. Os resultados dos estudos de adsorção de CHO nos materiais híbridos apontam a preferência para o meio apolar, especialmente em clorofórmio. A avaliação cinética mostrou que o tempo de equilíbrio era alcançado rapidamente, de 12 e 20 minutos para os polímeros sintetizados na relação molar MAA/TEOS de 6:1 e 1:5, respectivamente e a adsorção se ajustou ao modelo de pseudo-segunda ordem apontando para a natureza química do processo de adsorção, enquanto a equação de Langmuir-Freundlich apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais, sugerindo a existência de dois tipos de adsorção. As capacidades máximas de adsorção obtidas para os polímeros sintetizados nas relações molares MAA/TEOS de 6:1 e 1:5 foram de 214,8 e 166,4  $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente, com uma maior capacidade de adsorção para os polímeros impressos em relação aos polímeros não impressos correspondentes. Para o estudo de seletividade de CHO na presença de compostos análogos estruturalmente (5- $\alpha$ -colestano e 7-dehidrocolesterol), o polímero sintetizado na relação molar MAA/TEOS de 6:1 foi muito mais seletivo para o CHO do que o preparado na proporção de 1:5, o que segundo os autores, sugere que os sítios de ligação seletiva são providos pelo grupo carboxila da MAA, que desempenha um papel central no efeito de impressão dos materiais.

Esse polímero foi avaliado para limpeza e extração seletiva de CHO em amostras de leite. A análise do leite foi inicialmente baseada na saponificação seguida de extração líquido-líquido. Em seguida, o protocolo de extração de fase sólida impressa molecularmente foi realizado, carregando-se o extrato saponificado de leite em 200,0 mg de MIP ou NIP empacotados em cartuchos de SPE. A etapa de lavagem foi realizada utilizando n-hexano e a eluição com etanol, com posterior análise por HPLC-DAD. Cromatogramas mais limpos foram obtidos para amostras de leite submetidas a extração em fase sólida pelo MIP em comparação com a extração em fase sólida usando o NIP ou octadecil sílica modificada (C18). Nas amostras de leite, os autores obtiveram recuperações variando de 96,6 a 102,2% para amostras de leite fortificados com CHO, o que atesta a exatidão do método proposto (CLAUSEN, VISENTAINER e TARLEY, 2014).

Dependendo dos tipos de ligações químicas entre a molécula molde e o monômero existem três métodos distintos de impressão molecular para o preparo dos MIPs: impressão molecular covalente, impressão molecular não-covalente e impressão molecular semi-covalente (DENG e WANG, 2014).

A impressão covalente usa uma ligação covalente reversível para ligar o molde com o monômero. Após a polimerização, a ligação covalente é quebrada para libertar o molde do polímero sólido e fornecer um sítio impresso. No processo de religação, o molde se associa novamente por meio da mesma ligação covalente (MADHURI et al., 2014). No entanto, a dificuldade em projetar um complexo monômero-molde no qual a formação da ligação covalente e a clivagem são facilmente reversíveis torna esta síntese bastante restritiva (MARTÍN-ESTEBAN, 2013; MAYES E WHITCOMBE, 2005).

Diferentemente da síntese covalente, a síntese não covalente é baseada na formação de interações não covalentes (ligações de hidrogênio, interações entre íons) entre a molécula molde e o monômero funcional antes da polimerização (MADHURI et al., 2014). O procedimento experimental é bastante simples, com uma grande variedade de monômeros capazes de interagir com a maioria de possíveis moléculas molde comercialmente disponível, sendo esta síntese, a mais usada para a preparação de MIP. No entanto, as interações molécula molde e monômero são regidas por um processo de equilíbrio e, a fim de deslocar o equilíbrio para a formação do complexo monômero-molde, uma grande quantidade de monômero é usada e, conseqüentemente, o excesso de monômeros livres é incorporado aleatoriamente na

matriz polimérica, levando à formação de diâmetros de partículas e sítios de ligação menos uniformes (MARTÍN-ESTEBAN, 2013; MAYES E WHITCOMBE, 2005).

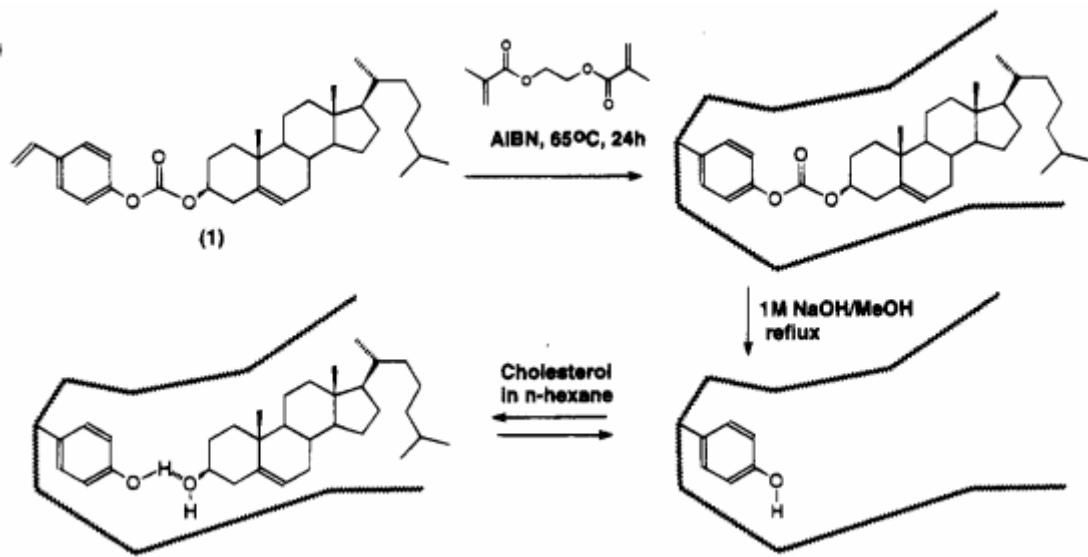
Uma opção intermediária é a síntese semi-covalente. Neste caso, o molde também é ligado covalentemente a um monômero funcional antes da polimerização, mas a religação é baseada apenas em interações não covalentes (LI e ROW, 2018). A síntese semi-covalente é uma tentativa de agregar as vantagens da rota sintética covalente (controle rigoroso da localização do grupo funcional e distribuição mais uniforme dos sítios de ligação) com a rota sintética não covalente (reduzir a restrição cinética no processo de religação) (CHEN et al., 2016; EWEN E STEINKE, 2008).

Uma outra vantagem dessa síntese, é que devido às diferentes interações estabelecidas entre o molde e o monômero funcional antes do processo de polimerização e durante o uso do material, uma proporção menor de molécula molde e monômero funcional é necessário para garantir a melhor impressão no polímero final. A razão molar entre o molde e o monômero funcional usado é baixo, geralmente 1:1 ou 1:2, enquanto para a síntese não-covalente, as razões tipicamente variam de 1:4 a 1:8, dependendo da afinidade do monômero funcional com o molde (BELTRAN et al., 2010).

Inicialmente a impressão semi-covalente foi projetada com o uso de um espaçador sacrificial para a obtenção da cavidade polimérica, onde um éster é sintetizado a partir de um ácido carboxílico e de um álcool para em seguida, passar pela etapa de polimerização. No entanto, a hidrólise do molde muitas vezes não é direta e as exigências estéricas de um ácido e um álcool no contato de ligação de hidrogênio são bastante diferentes do éster correspondente, o que dificulta em grande parte a impressão (MAYES e WHITCOMBE, 2005).

Esse método foi reportado pela primeira vez por Whitcombe et al., (1995), utilizando o éster 4-vinilfenilcarbonato como monômero ligado covalentemente ao colesterol (molde), que é facilmente clivado, com a perda de CO<sub>2</sub>. O grupo carbonila agiu como um “espaçador sacrificial”, resultando na formação de um sítio de reconhecimento para o CHO por interações não covalentes. O esquema proposto pelos autores é apresentado na Figura 6.

**Figura 6** - Esquema de síntese semi-covalente com espaçador sacrificial proposto pelos autores



Fonte: adaptado de Whitcombe et al., (1995)

Além da escolha adequada dos reagentes e de avaliar qual a abordagem de impressão molecular, o procedimento de síntese também tem influência no material final. Polímeros molecularmente impressos podem ser preparados em uma variedade de formas, conforme aplicação desejada (MALIK et al., 2019).

O método convencional para sintetizar MIP é a polimerização em *bulk*, amplamente empregada por ser simples e de fácil controle. Todos componentes envolvidos nesta técnica são dissolvidos em um volume baixo de um solvente porogênico adequado e o sistema é deixado para polimerizar (BELTRAN et al., 2010). Entretanto, o material obtido por essa técnica precisa ser moído e peneirado para obtenção de um material particulado com o tamanho desejado e estes procedimentos prejudicam a morfologia das partículas, deixando-as com tamanhos e formas irregulares, não sendo indicado como material adsorvente, uma vez que durante a trituração, alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos, o que diminui a capacidade seletiva de retenção do polímero (DENG E WANG, 2014; HU et al., 2013).

Visando evoluir nos processos de síntese de polímeros molecularmente impressos, superar os inconvenientes da técnica tradicional e facilitar o processo de adsorção e eluição, a combinação dois ou mais materiais passou a ser estudada. Dessa forma, a estratégia de impressão molecular de superfície é outra abordagem

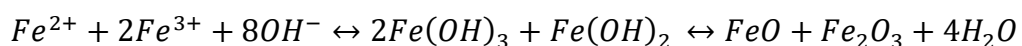
para a obtenção de MIP. Essa proposta é capaz de gerar uma fina camada de material impresso na superfície de um suporte. Assim os locais de reconhecimento são posicionados perto da superfície, dentro de cavidades do material suporte. Isso é benéfico para a remoção eficiente de moldes e melhorar a acessibilidade desses sítios no processo de religação. Além disso, os MIP de superfície tendem a ser mais robustos fisicamente devido à presença do suporte, que desempenha um papel fundamental para o desempenho dos MIP (WANG et al., 2019).

## 2.4 MATERIAIS MAGNÉTICOS

A impressão de um polímero em um núcleo com propriedades magnéticas (por exemplo, ferro, níquel, cobalto, suas ligas ou óxidos), proporciona maior área de superfície por volume, tornando as cavidades impressas mais acessíveis ao analito. Na aplicação de separação de fase sólida magnética, os passos tradicionais de operação, filtração e centrifugação são simplificados e, a separação sólido-líquido pode ser rapidamente alcançada pelo efeito do campo magnético externo (ANSARI e KARIMI, 2017; YÁÑEZ-SEDEÑO, CAMPUZANO e PINGARRÓN, 2017).

Partículas magnéticas de óxido de ferro ( $Fe_3O_4$ ), são consideradas ideais para aplicações biológicas e ambientais, utilizando-se de suas propriedades magnéticas que podem ser manipuladas por um campo magnético externo permitindo a separação do material do meio de análise (CHANG, CHEN e LI, 2012).

A síntese dessas partículas magnéticas de óxidos de ferro pode ser realizada pelo método co-precipitação, com uma mistura estequiométrica de sais de Fe (II) e Fe (III) em meio aquoso básico de hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de amônio ( $NH_4OH$ ), conforme a sequência de reações a seguir (YAMAURA et al., 2004).



As condições experimentais são importantes e dependem do tipo de sal iônico (cloretos, sulfatos, nitratos ou percloratos) e, da relação de concentração entre  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ . Outros parâmetros de síntese, como atmosfera inerte, pH, força iônica do meio e temperatura de reação, podem ser ajustados na síntese para controlar e melhorar as propriedades magnéticas (CAMPOS et al., 2015).

Vários tipos de óxidos de ferro subsistem na natureza, os mais comuns são magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sendo que a estrutura cristalina dos três óxidos pode ser definida em termos de planos compactos de ânions de oxigênio com cátions de ferro em sítios intersticiais octaédricos ou tetraédricos (WU, HE e JIANG, 2008).

Devido ao seu polimorfismo, a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) é uma das fases cristalográficas mais interessantes de óxido de ferro, especialmente em suas formas nanométricas. Exibindo o magnetismo mais forte de qualquer óxido de metal de transição, tornou-se importante minério de ferro e recurso natural para a indústria elétrica. Nessa estrutura, o íon ferro está presente em dois estados de oxidação (II e III,  $\text{FeO}$  e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), possui estrutura inversa de espinélio e com os íons Fe nos interstícios octaédricos, responsáveis pela magnetização de saturação ou pelo comportamento magnético do material. No entanto, pode perder gradualmente suas propriedades magnéticas quando submetido a um meio de reação em condições extremas, devido a facilidade de oxidação do ferro (II) em ferro (III) (MENDONÇA, et al., 2019).

A maghemite ocorre nos solos como um produto de intemperismo de magnetita ou como um produto de aquecimento de outros óxidos de ferro, apresentando propriedades magnéticas semelhantes a magnetita. A hematita, é o óxido de ferro mais conhecido e o polimorfo mais frequente que existe na natureza como mineral, com um comportamento ferromagnético fraco ou anti-ferromagnético à temperatura ambiente, é extremamente estável sob condições ambientais (WEGMANN e SCHARR, 2018).

Apesar de desenvolvimentos significativos na síntese de partículas magnéticas, manter a estabilidade desse material por um longo tempo, sem aglomeração, precipitação ou perda de magnetismo, ainda são questões importantes, sendo a estabilidade é um requisito importante para a aplicação desse material. Metais, especialmente puros, como ferro, cobalto e níquel e seus respectivos óxidos são muito sensíveis ao ar, sendo essa a maior dificuldade para o uso. A suscetibilidade para a oxidação torna-se maior quanto menor as partículas e faz-se necessário estratégias para melhorar a estabilidade química desse material (SILVA, PINEDA e BERGAMASCO, 2014).

Uma das estratégias é dispersar as partículas magnéticas em uma matriz, com uma variedade de configurações possíveis (dispersos em uma matriz amorfa,

enxertados em partículas maiores de mesoescala ou estruturas tridimensionais bem definidas) que além da estabilidade, também podem introduzir novas propriedades físicas e biológicas e comportamento multifuncional (BEHRENS, 2011).

Uma alternativa para proteger óxidos de ferro, é a incorporação em uma rede de sílica, proporcionando uma maior dispersão das partículas de óxido de ferro em solução, preservação da atração magnética, maior estabilidade e resistência ao meio ácido. Ainda, é possível efetuar modificações na superfície da sílica (os abundantes grupos silanol podem ser facilmente ativados) e nos poros da sílica (como a polimerização, proporcionando cinética de sorção mais rápida e aumento na capacidade de sorção). Uma cápsula de sílica não protege apenas os núcleos magnéticos, mas também impede o contato direto com agentes prejudiciais ao magnetismo, evitando interações indesejáveis (SPELTINI et al., 2017; WEGMANN e SCHARR, 2018).

A impressão de MIPs em superfícies suportes, por exemplo,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , nanotubos de carbono,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , e outros materiais porosos, tem sido bem-sucedida, aumentando a capacidade de ligação e reduzindo o tempo de equilíbrio, sendo a capacidade de ligação dependente da área de superfície do suporte sólido (XIE et al., 2015; ZHAO et al., 2008).

Portanto, materiais com grande área de superfície têm potencial para a aplicação de MIPs de superfície e ganharam muita atenção na separação em fase sólida, e a integração desses materiais com polímeros molecularmente impressos é, sem dúvida, de grande interesse para aplicações práticas (XIE et al., 2015).

## 2.5 SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO MAGNÉTICO

Em face das vantagens dos polímeros molecularmente impressos e materiais magnéticos, estudos recentes tem reportado a união dos materiais em um único adsorvente chamado polímero molecularmente impresso magnético (LI e ROW, 2018). O primeiro artigo publicado relatando o uso de MIP magnético data de 1998, por Ansell e Mosbach, em que o óxido de ferro foi incorporado ao polímero usando uma metodologia de polimerização em suspensão com perfluorocarbono como fase de dispersão e monômero funcional ácido metacrílico-1,1,1-trimetilolpropano, para o (S)-propranolol. O material resultante foi capaz de se ligar ao (S)-propranolol mais

fortemente do que o polímero não impresso. A seguir será discutido de forma sucinta a fundamentação teórica e aplicação de MIPs magnéticos.

Os polímeros molecularmente impressos magnéticos atraíram atenção considerável nos últimos anos devido à sua capacidade de reconhecimento, estabilidade magnética, preparação relativamente simples e de baixo custo, sendo amplamente utilizados na extração em fase sólida magnética. Com uma gama de moléculas alvo, possuem potencial para aplicação em separação e purificação nas áreas de alimentos, ambiental e eletroquímica (LI e ROW, 2018; ANSARI, 2017a).

A síntese de polímeros molecularmente impressos em superfície é realizada após a obtenção do núcleo do material e de sua proteção. Inicialmente sintetiza-se o óxido de ferro, envolve-se sua estrutura em outro material para a preservação de suas propriedades magnéticas e obtenção de novas propriedades (ANSARI, 2017a).

O procedimento geral para a obtenção dos polímeros magnéticos é descrito a seguir (KWAŚNIEWSKA, GADZAŁA-KOPCIUCH E BUSZEWSKI, 2015; ANSARI e KARIMI, 2017):

- Síntese de um material magnético, comumente o óxido de ferro.
- Proteção do óxido de ferro, preservando a sua propriedade magnética e funcionalizando sua superfície (a sílica é um dos materiais mais empregados, através da ligação dos grupos silanóis as hidroxilas do óxido de ferro).
- Após a realização dos passos descritos acima, procede-se a síntese do polímero. Inicialmente, a molécula molde é dissolvida e o monômero funcional é adicionado. A mistura resultante é agitada para preparar a solução de pré-polimerização.
- O óxido de ferro envolto em sílica previamente preparado é misturado com o agente de reticulação e a solução de pré-polimerização. Esta mistura é agitada e o iniciador de radical é então adicionado. O agente de reticulação liga-se a rede de sílica por interação com os grupos silanóis da superfície.
- A mistura resultante é dispersada em solvente em um balão de fundo redondo próprio para reações, agitada e purgada com nitrogênio gasoso para a retirada do oxigênio do meio reacional, enquanto a temperatura é aumentada para um valor adequado.

- Após a polimerização, o material é lavado várias vezes até que a molécula molde tenha sido completamente retirada. Por fim, o material é levado para secar.

Na literatura encontra-se duas vertentes principais para a aplicação dos polímeros magnéticos: extração de compostos de matrizes complexas (amostras ambientais, alimentares e biológicas) e acoplamento a sensores eletroquímicos.

O uso de polímeros magnéticos no campo da separação tem atraído considerável atenção nos últimos anos, devido à alta eficiência de reconhecimento e seletividade, baixo custo, possibilidade de procedimentos em larga escala e pequenas quantidades de resíduos tóxicos.

Khan e colaboradores (2018), sintetizaram um polímero magnético molecularmente impresso para a análise de ametrina (4-N-etil-6-metilsulfanil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina), um popular herbicida. A metodologia analítica desenvolvida, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (HPLC-UV), mostrou seletividade adequada e apresentou limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 25,0 e 82,0 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O material foi aplicado em amostras de tomate, pimentão e morango, obtendo-se recuperações de 102,0%±6,0%. Os estudos foram realizados com adição de padrão, já que a contaminação estava abaixo do limite de quantificação do método.

Yuan e colaboradores (2016), apresentaram uma nova estratégia para a extração de bisfenol A (BPA) do leite, empregando óxido de ferro recoberto com sílica como núcleo e obtendo cavidades de reconhecimento altamente seletivas com a impressão de um polímero baseado em monômeros funcionais binários, 4-vinilpiridina (4-VP) e beta-ciclodextrina (β-CD). Os resultados da caracterização sugeriram que o MIP foi sintetizado uniformemente na superfície do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> e os experimentos de adsorção revelaram que o material apresentou melhor capacidade de extração e seletividade para o BPA e seus análogos do que os polímeros não impressos (NIPs). A capacidade máxima de adsorção foi de 17,98 mg g<sup>-1</sup> e a recuperação de BPA em amostras de leite foi 99,21%, 98,07% e 97,23%, respectivamente, para três concentrações: 1,0 μmol L<sup>-1</sup>, 10,0 mol L<sup>-1</sup>, 100,0 μmol L<sup>-1</sup>. A avaliação dos autores foi que material pode ser usado para remover o BPA em amostras de leite.

Chen e colaboradores (2009), sintetizaram polímeros magnéticos molecularmente impressos usando oxitetraciclina como molécula molde, ácido metacrílico como monômero funcional e estireno e divinilbenzeno como componentes

da matriz polimérica. O material foi aplicado à separação de antibióticos de tetraciclina de amostras de ovos e tecidos, realizando o procedimento de extração e limpeza em uma única etapa com a agitação da amostra na presença do solvente de extração e adsorvente e posteriormente, separando o polímero facilmente com um ímã. A viabilidade deste método foi validada pela análise de amostras de ovos, comparando os resultados com os obtidos pelo método clássico (extração por solvente, centrifugação e posterior limpeza e concentração por extração em fase sólida). As recuperações variaram de 72,8% a 96,5% (com desvios padrão relativos na faixa de 2,9 a 12,3%). Segundo os autores, o método proposto reduziu as complicações do método clássico e melhorou a confiabilidade dos resultados obtidos.

Cheng e colaboradores (2019), usaram a quercetina como molécula molde para um polímero magnético molecularmente impresso com estrutura core-shell, preparado por impressão molecular de superfície. O material apresentou alta capacidade de adsorção e reconhecimento específico para a quercetina. A capacidade máxima de adsorção foi 10,52 mg g<sup>-1</sup>, atingindo o equilíbrio de ligação em 30 minutos. O adsorvente foi aplicado com sucesso para extrair e determinar a quercetina a partir de amostras de maçã com recuperações relativamente altas (89,2–93,6%) e desvios padrão relativos de menores que 5%. A avaliação dos autores foi que o sorvente têm potencial para determinação de quercetina em amostras reais.

Por sua vez, na eletroquímica a principal aplicação de MIP magnéticos é como sensores eletroquímicos, fornecendo métodos de detecção rápidos para a molécula molde. A propriedade magnética facilita a incorporação dos materiais poliméricos na superfície do eletrodo, com características analíticas atraentes em termos de simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo, alta seletividade e rápido tempo de separação.

Lahcen e colaboradores (2017), relatam a síntese, caracterização e estudo eletroquímico de um polímero molecularmente impresso magnético para a determinação de 17- $\beta$ -estradiol (17- $\beta$ -E2). A caracterização eletroquímica foi estudada por voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Com as condições de análise otimizadas, a corrente de pico de oxidação foi linearmente relacionada à concentração de 17- $\beta$ -E2 na faixa de 0,05 a 10,0  $\mu$ M. O sensor baseado no material sintetizado amplifica a corrente de oxidação em medições voltamétricas de onda quadrada que permite atingir 20,0 nM como limite de detecção. Ainda, o sensor exibe uma alta seletividade em relação ao analito e foi aplicado com sucesso para sua

determinação em amostras de água do rio, com recuperações de 96,0% e 97,0% para a adição de 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  de 17- $\beta$ -E2, respectivamente, e desvio padrão relativo na faixa de 5,2-6,5%.

Hassan e colaboradores (2018), realizaram a detecção eletroquímica do pesticida organofosforado *metil paration* em peixes, pré-concentrando o analito em um polímero magnético molecularmente impresso e análise eletroquímica com um eletrodo magnético em voltametria de onda quadrada. Esse sensor eletroquímico mostrou excelente desempenho analítico para a detecção do analito em peixes, com um limite de detecção baixo ( $1,22 \times 10^{-6} \text{ mg mL}^{-1}$ ) e valores de recuperação variando de 89,4% a 94,7%. A perspectiva apontada pelos autores é que o material sintetizado apresentou seletividade pronunciada para o analito a partir das amostras complexas, permitindo expandir este material em outras áreas, para a detecção deste pesticida em controle ambiental e de segurança alimentar.

Jiang e colaboradores (2016), desenvolveram um novo sensor eletroquímico para medir moléculas sinalizadoras de bactérias Gram-negativas usando polímeros impressos molecularmente em um núcleo magnético. O material magnético foi depositado em uma superfície de eletrodo magnético (m-GEC) e caracterizado por medidas eletroquímicas. A voltametria de pulso diferencial foi utilizada para registrar o sinal de corrente oxidativa e o limite de detecção deste ensaio foi determinado em  $8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  com uma faixa de detecção linear de  $2,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Os autores apontam que este sensor eletroquímico é uma nova ferramenta que permite a medição quantitativa de moléculas sinalizadoras de bactérias Gram-negativas, com aplicações potenciais nas áreas de diagnóstico clínico ou análise de alimentos, capacidade de detecção em tempo real, alta especificidade, excelente reprodutibilidade e boa estabilidade.

## 2.6 ESTUDO DE CINÉTICA DE SORÇÃO

O processo de sorção é um fenômeno superficial pelo qual uma mistura de fluido de vários componentes (gás ou líquido) é atraída para a superfície de um adsorvente sólido por ligações físicas ou químicas. Reconhecido como uma abordagem promissora, é amplamente utilizada, principalmente pela sua simplicidade (FOO e HAMEED, 2010).

Prever a taxa de remoção de um analito no processo de sorção é um fator importante a ser estudado. Para isso, alguns modelos cinéticos têm sido empregados para avaliar a natureza do processo cinético de adsorção. A principal vantagem é a simplicidade e facilidade na aplicação para correlacionar os dados sem a necessidade de usar procedimentos computacionais avançados. Na maioria das vezes, mais de um modelo cinético é avaliado a fim de obter-se o melhor ajuste aos dados (PLAZINSKI, RUDZINSKI e PLAZINSKA, 2009).

O tempo de equilíbrio está diretamente ligado a capacidade máxima que um adsorvente pode reter um adsorvato. A quantidade máxima sorvida ( $Q_e$ ) é calculada de acordo com a Equação 1:

$$Q_e = (C_0 - C_e) * \frac{V}{m} \quad \text{Equação 1}$$

Um dos primeiros modelos cinéticos para a sorção em superfícies sólidas em um sistema de adsorção sólido/líquido foi a de Lagergren, em 1898, também conhecida como equação cinética de pseudo-primeira ordem. Utilizada amplamente em processos de adsorção do soluto de uma solução líquida e está baseada na capacidade de adsorção do sólido (AZIZIAN, 2004).

Este modelo pressupõe que a taxa de ocupação dos locais de sorção é proporcional ao número de locais desocupados. Dessa forma, o modelo assume que no momento inicial da sorção as quantidades de locais de ligação livre são muito maiores do que no equilíbrio. Assim, este modelo deve ser usado no período inicial de sorção e sofre de algumas limitações ao longo do tempo de sorção (OLIVEIRA, SEGATELLI e TARLEY, 2016). O modelo de pseudo-primeira ordem é representado pela Equação 2 na sua forma não linearizada e pela Equação 3 na sua forma linearizada:

$$Q_t = Q_e - Q_e^{-K_f * t} \quad \text{Equação 2}$$

$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{K_f}{2,303} t \quad \text{Equação 3}$$

Em que,  $K_f$  ( $L \text{ min}^{-1}$ ) é a constante de velocidade de adsorção pseudo 1ª ordem;  $t$  (min) é o tempo de adsorção;  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a quantidade de adsorvato adsorvida no equilíbrio e  $Q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a quantidade de adsorvato adsorvida no tempo  $t$ .

O modelo cinético de pseudo-segunda ordem também é baseado na capacidade de sorção da fase sólida e relata o comportamento do processo em toda a faixa de tempo de contato. Reconhece que a capacidade de sorção é proporcional ao número de locais ativos ocupados no sorvente envolvendo locais com diferentes energias de ligação e é capaz de prever a sorção de adsorvato em toda a extensão da sorção (AZIZIAN, 2004), sendo a forma não linearizada descrita pela Equação 4 e a forma linearizada descrito pela Equação 5:

$$Q_t = \frac{t * K_s * Q_e^2}{1 + (t * k_s * Q_e)} \quad \text{Equação 4}$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_s \cdot Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \cdot t \quad \text{Equação 5}$$

Em que  $K_s$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) é a constante de velocidade de adsorção de pseudo-segunda ordem;  $t$  (min) é o tempo de adsorção;  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a quantidade de adsorvato adsorvida no equilíbrio e  $Q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a quantidade adsorvida no instante  $t$ .

O modelo linear de Elovich assume que o material possui sítios ativos com diferentes energias, sendo complementar ao modelo de pseudo-segunda ordem (AZIZIAN, 2004) e é descrito pela Equação 6:

$$Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad \text{Equação 6}$$

Na qual  $\alpha$  é a taxa de sorção inicial ( $\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) e  $\beta$  é a constante relacionada com a extensão da superfície de cobertura e a energia de ativação ( $\text{g mg}^{-1}$ ).

O modelo de difusão intrapartícula, mostra a dependência da adsorção em função da raiz quadrada do tempo, em que  $Q_t$  é a quantidade de soluto na superfície do sorvente no tempo  $t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_{id}$  a taxa de difusão intrapartícula constante ( $\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{1/2}$ ),  $t$  o tempo (min) e  $C$  a intercepção, significando a espessura da camada limite ( $\text{mg g}^{-1}$ ), tempo  $t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_{id}$  a taxa de difusão intrapartícula constante ( $\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{1/2}$ ),  $t$  o tempo (min) e  $c$  a intercepção, significando a espessura da camada limite ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

(PLAZINSKI, RUDZINSKI e PLAZINSKA, 2009). Esse modelo é expresso pela Equação 7:

$$Q_t = K_{id}t^{0,5} + c \quad \text{Equação 7}$$

Esse modelo mostra que a difusão intrapartícula não é o único processo que ocorre, mas outros processos também controlam a velocidade de sorção (PLAZINSKI, RUDZINSKI e PLAZINSKA, 2009).

## 2.7 ESTUDOS DE ISOTERMAS DE SORÇÃO

Isoterma de sorção é uma curva que descreve o fenômeno que governa a retenção (ou liberação) de uma substância de uma solução uma fase sólida a uma temperatura constante e pH. O equilíbrio de sorção (a razão entre a quantidade sorvida e o restante na solução) é estabelecido quando uma fase contendo sorvato permaneceu em contato com o sorvente por tempo suficiente. Os parâmetros obtidos com a aplicação de modelos matemáticos fornecem uma visão sobre o mecanismo de adsorção, as propriedades da superfície, bem como o grau de afinidade dos sorventes (FOO e HAMEED, 2010).

Dos vários modelos existentes, um dos mais utilizados é o modelo da isoterma de Langmuir, inicialmente utilizada para descrever a sorção de gases por sólidos, baseia-se em três suposições: (a) a superfície de sorção é homogênea, isto é, a sorção é constante e independente da extensão da cobertura da superfície; (b) a sorção ocorre em sítios específicos, sem interação entre as moléculas do soluto; (c) a sorção torna-se máxima quando uma camada monomolecular cobre totalmente a superfície do sorvente. Embora apenas alguns sistemas de sorção satisfaçam estas condições, muitos processos foram descritos com a equação de Langmuir, devido a sua conveniência para o ajuste de curva (DADA, 2012). A equação de Langmuir é apresentada na Equação 8 e sua forma linearizada pela Equação 9:

$$Q_e = \frac{Q_{max} * K_L * C_{eq}}{1 + Q_{max} * C_{eq}} \quad \text{Equação 8}$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m \cdot K_L} + \frac{C_e}{K_L} \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade de analito sorvida por grama de sorvente;  $C_{eq}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a concentração de contaminante (adsorvato) no equilíbrio;  $K_L$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a constante de adsorção de Langmuir, que indica a afinidade do sorvente pelo sorvato na monocamada e  $Q_{max}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a capacidade máxima de sorção.

A isoterma de Freundlich, apresentada na Equação 10 para a forma não linearizada e na Equação 11 para a forma linearizada, é um modelo empírico, em que a principal restrição é a não previsão da saturação dos sítios, podendo ser usado somente na faixa de concentração em que foram ajustados seus parâmetros (DADA, 2012).

$$Q_e = K_F * C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 10}$$

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \cdot \ln C_e \quad \text{Equação 11}$$

Em que  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade sorvida na fase sólida;  $K_F$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a constante de Freundlich;  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ): a concentração de equilíbrio na fase líquida e  $n$  é um parâmetro empírico de Freundlich. A equação de Freundlich também é muito utilizada e se ajusta relativamente bem aos dados experimentais de diversos sorventes (FOO e HAMEED, 2010).

A combinação dos dois modelos descritos anteriormente originou o modelo de Langmuir-Freundlich para um sítio, assumindo a presença de sítios com energias homogêneas, em que não há diferença de afinidade em relação ao sorvato. Esse modelo se reduz ao de Freundlich quando o sorvato está em baixas concentrações, contudo quando em altas concentrações, prediz capacidade de sorção em monocamada, característico ao modelo de Langmuir. A Equação 12 representa o modelo Langmuir-Freundlich para um sítio.

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

Em que  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade de analito sorvida por grama de sorvente;  $C_{eq}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a concentração de analito no equilíbrio;  $K$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a constante de adsorção

de Langmuir-Freundlich,  $b$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a capacidade máxima de sorção em cada sítio e  $n$  é o parâmetro de heterogeneidade.

Ainda, o modelo Langmuir-Freundlich para dois sítios de sorção (Equação 13) assume a existência de sítios de ligação com diferentes afinidades com o sorvato, sendo que, em baixas concentrações, o sorvato interage com o sítio de maior afinidade e, em altas concentrações, interage com os sítios de menor afinidade.

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

Em que  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade de analito sorvida por grama de sorvente;  $C_{eq}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a concentração de analito (sorvato) no equilíbrio;  $K_1$  e  $K_2$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a constante de adsorção de Langmuir-Freundlich,  $b_1$  e  $b_2$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a capacidade máxima de sorção em cada sítio e  $n$  é o parâmetro de heterogeneidade.

### 3. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar um polímero molecularmente impresso magnético, explorando a síntese semi-covalente e, posterior caracterização e aplicação como material de adsorvente para a extração e determinação de CHO em amostra de leite.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar em etapas um polímero molecularmente impresso magnético para a molécula de colesterol e o seu polímero controle não impresso.
- Realizar a caracterização química e estrutural dos materiais sintetizados com as técnicas de reflexão total atenuada no infravermelho, fisiossorção de gás nitrogênio, difração de raios X, fluorescência de raios X, medidas de magnetização, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar o efeito do meio de extração (solvente) do colesterol, efeito do eluente, tempo de agitação e massa de material adsorvente no procedimento de extração em fase sólida magnética dispersiva usando o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .
- Avaliar a seletividade do polímero magnético frente a interferentes.
- Obter a quantidade máxima de adsorção, cinética e isotermas de adsorção.
- Estabelecer as figuras de mérito do método proposto.
- Aplicar o método desenvolvido na quantificação de colesterol em amostras de leite bovino.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados durante os experimentos foram de grau analítico e sem purificação prévia. Colesterol (Sigma-Aldrich, 95,0%), metanol (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  99,9%), etanol (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  99,5%), clorofórmio (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  99,8%), hexano (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  95,9%), acetonitrila (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  99,9%), acetona (Sigma-Aldrich, grau HPLC  $\geq$  99,9%), tetrahidroxifurano anidro (Sigma-Aldrich,  $\geq$  99,9%), dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich,  $\geq$  99,9%), água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Elga Purelab Máxima (High Wycombe, Bucks, UK), resistividade 18,2 M $\Omega$  cm e filtradas em filtro de teflon® 0,45  $\mu$ m. Para a síntese do material: os sais cloreto de ferro III (FeCl<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O) e cloreto de ferro II (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, tetraetoxisilano (TEOS, Sigma-Aldrich, 98%), metassilicato de sódio pentahidratado (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich), 3-triethoxisilil propil isocianato (Sigma-Aldrich, 99,0%), 3-aminopropil triethoxisilano (Sigma-Aldrich, 99%), soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) preparadas com diluição apropriada a partir dos respectivos reagentes concentrados (Merck).

### 4.2 EQUIPAMENTOS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA DISPERSIVA E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

#### 4.2.1 Determinação por cromatografia líquida

As determinações cromatográficas do CHO foram realizadas por um cromatógrafo a líquido (HPLC-DAD) modelo LC-20AT, Shimadzu (Tóquio, Japão), operando no modo isocrático, com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, utilizando fase móvel de acetonitrila e água (95:5, v/v) (YAVUZ et al., 2007) e a detecção realizada em  $\lambda_{\max}$  = 210 nm. A coluna utilizada foi C<sub>18</sub> (Phenomenex-250 mm x 4.5 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu$ m) e pré-coluna (Phenomenex®, 4.0 mm x 30 mm i.d., 5  $\mu$ m). A temperatura de operação do forno foi ajustada em 30°C. Para o estudo dos interferentes, a mesma condição cromatográfica foi utilizada, com detecção em 208 nm.

#### 4.2.2 Caracterização dos materiais sintetizados

As medidas de espectroscopia vibracional no infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas em espectrofotômetro infravermelho módulo ATR (Reflexão Total Atenuada) acoplado, FT-IR Bruker® Vertex 70, acessório de refletância Platinum ATR, onde foram realizadas varreduras de 16 scans e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , no intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Análise realizada no Laboratório de Química Prebiótica (LQP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

As análises de fisiossorção de gás  $\text{N}_2$  para a área específica, tamanho e volume de poros foram realizadas empregando um analisador Quantachrome® Nova 1200, por meio da sorção de nitrogênio, sendo os dados de área específica calculados a partir do modelo de BET (Brunauer, Emmett, Teller), e o volume e tamanho de poros determinados pelo modelo de BJH (Barrett, Joyner, Halenda). Inicialmente os materiais foram aquecidos sob vácuo a  $120^\circ\text{C}$  por 4 horas e, posteriormente, submetidos a sorção de nitrogênio. O equipamento multiusuário é de responsabilidade do programa de pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina.

As medidas de difratometria de raios X de pó (DRX) foram realizadas em equipamento Shimadzu XRD-6000 operando a 30 kV e 40 mA, com fonte de radiação de cobre ( $\text{Cu-K}\alpha$ ) e comprimento de onda  $\lambda = 0,15418\text{ nm}$ . Os dados foram coletados de  $10$  a  $60^\circ$  a uma taxa de aquisição de  $2^\circ/\text{min}$ . As amostras foram dispersas homogeneamente sobre um amostrador de vidro. O equipamento é de responsabilidade do Laboratório de Análises por Técnicas de Raios X (LARX), da Universidade Estadual de Londrina.

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas utilizando o equipamento Netzsch STA449 F3 Jupiter, aquecendo  $10,0\text{ mg}$  do material numa faixa de  $30$  a  $900^\circ\text{C}$ , com taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio. A análise foi realizada na Universidade Federal da Grande Dourados.

A análise de fluorescência de raios X (FRX) foi realizada em um espectrômetro de Fluorescência de Raios X, modelo EDX-720, Shimadzu, com tubo de Rh e detector de silício dopado com lítio –  $\text{Si}(\text{Li})$ , utilizando o porta amostra de polietileno suportado em filme fino de poliéster (Chemplex, Palm Cit, USA), em dois canais Ti-U usando  $50\text{ kV}$ ,  $49\text{ }\mu\text{A}$  e Na-Sc usando  $15\text{ kV}$ ,  $391\text{ }\mu\text{A}$ , com tempo de análise de 100 segundos, fenda de colimação de  $3\text{ mm}$  em atmosfera de ar. O equipamento é de

responsabilidade do Laboratório de Análises por Técnicas de Raios X (LARX), da Universidade Estadual de Londrina.

As medidas de magnetização (VSM) foram realizadas em um magnetômetro Microsense, modelo 32 KP Gaussmeter a 303 K, com varrição de campo magnético entre -20 e 20 kOe. O equipamento encontra-se sob responsabilidade da Universidade de Guadalajara - México e as análises foram realizadas pelo professor Gregorio Guadalupe Carbajal Arízaga.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi registrada em um microscópio FE-SEM (TESCAN), modelo MIRA 3 LMU, Brno, Kohoutovice, República Checa. O equipamento encontra-se sob responsabilidade da Universidade de Guadalajara - México e as análises foram realizadas pelo professor Gregorio Guadalupe Carbajal Arízaga.

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas utilizando um microscópio JEOL® JEM-1400 com voltagem de aceleração de 120 kV. As amostras foram previamente preparadas por dispersão em álcool isopropílico ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e, posteriormente, a suspensão obtida foi gotejada em grades de cobre e secas em dessecador. O equipamento encontra-se sobre responsabilidade da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 4.3 PROCEDIMENTO DE SÍNTESE DO MATERIAL

A síntese do material foi realizada em três etapas, iniciando com a obtenção das partículas de óxido de ferro, seguido da proteção com sílica e posterior polimerização na superfície do óxido de ferro com sílica, com pequenas modificações nos procedimentos relatados por Güney e Güney, 2017; Qi et al., 2010; Yuan et al., 2012; Zhao et al., 2008.

##### 4.3.1 Síntese do óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

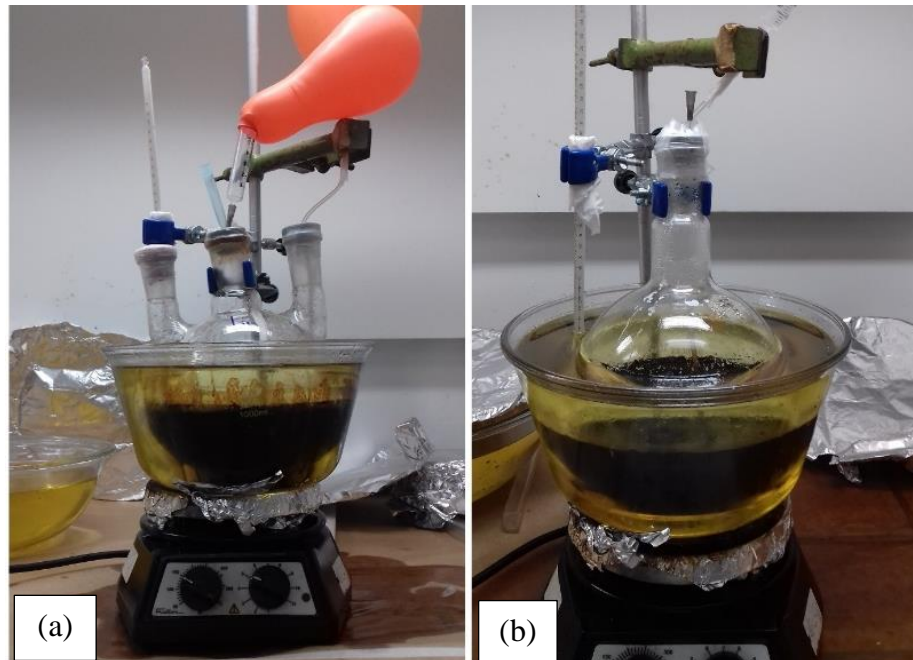
Em um balão de reação de 3 bocas adicionou-se 25,0 mL de HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , 25,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura fervida (resfriada a temperatura ambiente) e 10,8 g de cloreto de ferro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Utilizando-se uma chapa de aquecimento, montou-se um sistema com agitação constante e aquecimento com banho de óleo em  $60^\circ \text{C}$ . O balão de reação foi fechado e purgou-se  $\text{N}_2$ , deixando a atmosfera inerte.

Paralelamente, em um balão de reação de 1 boca adicionou-se 3,97 g de cloreto de ferro tetra hidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 25,0 mL de água ultrapura fervida (resfriada a temperatura ambiente), em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Lentamente, a solução obtida no balão de uma boca, foi adicionada ao balão de três bocas, com auxílio de uma seringa descartável. O sistema foi mantido sob agitação constante, com temperatura controlada através do banho de óleo em  $60^\circ \text{C}$  e atmosfera de  $\text{N}_2$ . Utilizando uma seringa, 250,0 mL de  $\text{NaOH}$   $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados ao meio reacional e o sistema permaneceu em agitação, aquecimento em banho de óleo ( $60^\circ \text{C}$ ) e atmosfera de  $\text{N}_2$  por 40 minutos. Decorrido o tempo, o sistema foi aberto, o material precipitado foi lavado com água ultrapura até atingir pH 7,0 na água de lavagem. Realizou-se teste mássico com 1,0 mL da suspensão, evaporando a água e pesando o sólido resultante, estimando a quantidade de material em suspensão. O material lavado permaneceu em suspensão aquosa e em atmosfera de  $\text{N}_2$ , aguardando posterior uso.

#### 4.3.2 Proteção do óxido de ferro com sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ )

Em um balão de reação de três bocas com 200,0 mL de água ultrapura fervida e resfriada e sob fluxo contínuo de  $\text{N}_2$ , adicionou-se 2,0 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em suspensão aquosa (calculado através do teste mássico). Em seguida, sob agitação magnética vigorosa, com auxílio de uma seringa, 40,0 mL de solução de metassilicato de sódio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  foram acrescentados na reação e o pH foi ajustado em 6,0, com a adição de solução aquosa  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HCl}$ . Manteve-se a mistura de reação sob agitação magnética e a temperatura de  $60^\circ \text{C}$  com banho óleo por 3,0 h. O sólido obtido foi lavado com água ultrapura até pH neutro e seco em estufa à  $70^\circ \text{C}$ . Na Figura 7, fotos do meio reacional são apresentadas: (a) síntese do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (b) síntese do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

**Figura 7 -** (a) meio reacional do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (b) meio reacional do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$



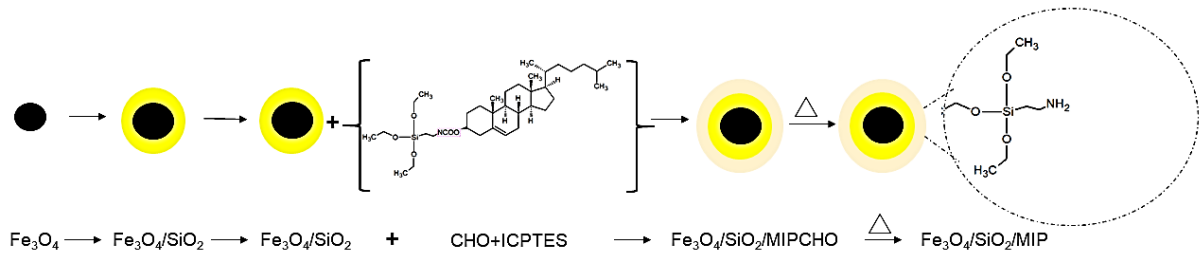
Fonte: o autor

#### 4.3.3 Polimerização do MIP na superfície do óxido de ferro com sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ )

Inicialmente, realizou-se a ligação do molde CHO ao monômero funcional 3-triethoxisilil propil isocianato (ICPTES) via ligação covalente. Em um balão de reação de 250,0 mL,  $11,0 \times 10^{-3}$  mol (3,0 g) de CHO ( $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ ) e  $22,0 \times 10^{-3}$  mol de ICPTES (5,44 mL) foram dissolvidos em 30,0 mL de tetrahydrofurano anidro (THF) e submetidos ao aquecimento por 24 horas sob fluxo de  $\text{N}_2$  a  $60^\circ \text{C}$  em banho de óleo. Decorrido o tempo, o solvente foi evaporado em rotavapor e um líquido viscoso foi obtido. Esse produto, CHO-ICPTES (1,0 g) foi dissolvido em 30,0 mL de metanol, seguido da adição de TEOS (6,0 g) e 1,5 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Esta mistura foi levada a sonicação por 15 min, seguido da adição de 1,5 mL de HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução foi mantida sob agitação por mais 24 horas. O material obtido foi centrifugado, lavado alternadamente com etanol e água ultrapura e depois seco à  $60^\circ \text{C}$ . A molécula molde, CHO, por se tratar de uma impressão química covalente com o monômero funcional, foi extraída por clivagem, com uma solução mista de dimetilsulfóxido e água na proporção de 5 para 1 (v/v) aquecida à  $160^\circ \text{C}$  durante 8 h. O produto obtido foi novamente lavado com etanol e água ultrapura por três vezes e depois seco a  $60^\circ \text{C}$ .

Uma representação esquemática da síntese pode ser vista na Figura 8.

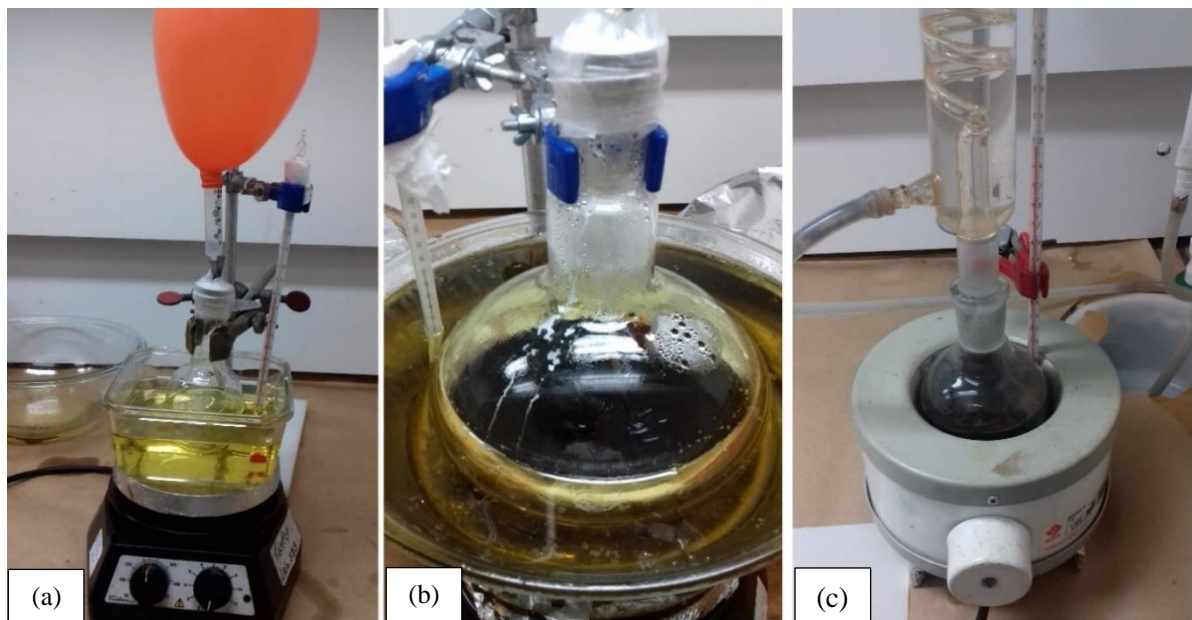
**Figura 8** - Representação esquemática da síntese do material



**Fonte:** o autor (cores e tamanhos não são representativos)

Na Figura 9, fotos das etapas de síntese do polímero na superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  são apresentadas: (a) do meio reacional da síntese do molde e do monômero funcional, (b) polimerização na superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e (c) da remoção do molde por clivagem química a  $160^\circ\text{C}$ .

**Figura 9** - (a) síntese do molde e monômero funcional, (b) polimerização na superfície do  $\text{F}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e (c) remoção do molde



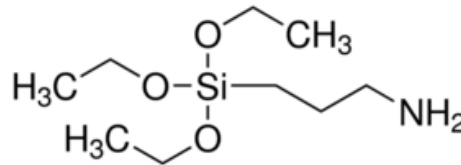
**Fonte:** o autor

#### 4.3.4 Síntese do $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$

Para a síntese do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  (material comparativo sem a impressão química) utilizou-se o óxido de ferro com sílica sintetizado, descrito nos itens 4.3.1 e

4.3.2. Seguiu-se os passos indicados para a polimerização, porém, o produto obtido da reação do CHO e monômero funcional foi substituído pelo (3-aminopropil) trietoxissilano (Figura 10), a fim de obter-se no  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , grupos funcionais iguais aos do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .

**Figura 10** – Estrutura do (3-aminopropil) trietoxissilano



Fonte: o autor

#### 4.4 ESTUDOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA DISPERSIVA

##### 4.4.1 Estudo do meio extrator para CHO pelo $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ e comparação com o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$

As extrações em fase sólida dispersiva foram realizadas com 10,0 mg do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , em 10,0 mL de uma solução de CHO 10,0 mg L<sup>-1</sup> preparada conforme o solvente em estudo: metanol, etanol, hexano, clorofórmio, acetonitrila e mistura de água e metanol na proporção 80:20 (v/v). A solução e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foram acondicionados em tubos falcon e levados para um homogeneizador de soluções, onde permaneceram em agitação por 1 hora. Avaliou-se também a adsorção pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , em que 10,0 mg foram levadas para a agitação com 10,0 mL de uma solução de CHO 10,0 mg L<sup>-1</sup> em clorofórmio. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi separado da fase sólida com a aplicação de um campo magnético externo e filtrado com auxílio de filtro de 0,45 µm. Uma alíquota de 1,0 mL foi coletada e levada para evaporar o solvente em chapa de aquecimento a 40 °C, após secura, o analito foi retomado em fase móvel e analisado por HPLC-DAD.

##### 4.4.2 Otimização do tempo de agitação e estudo cinético

Para o estudo do tempo de extração do CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , adotou-se a agitação por vortex a fim de aumentar a frequência analítica, visando o desenvolvimento de um método de extração em fase sólida magnética dispersiva. Em

um tubo de ensaio com tampa, 10,0 mg do polímero foram agitadas em vortex com 10,0 mL de uma solução de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de CHO em CHCl<sub>3</sub> com tempo máximo de 3 minutos. Após a separação das fases líquida e sólida com a aplicação de um campo magnético externo, 1,0 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm, evaporado em chapa de aquecimento a 40 °C e posteriormente retomado em fase móvel para determinação por HPLC-DAD. Os dados foram utilizados para a determinação da cinética de adsorção do material através dos modelos matemáticos descritos no Item 2.6.

#### 4.4.3 Influência da massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP na extração de CHO

A influência da massa do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP (5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg) foi avaliada na adsorção de CHO realizando agitação em vortex por 60 segundos da mistura com 10,0 mL de uma solução de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de CHO em CHCl<sub>3</sub>. Após a separação das fases líquida e sólida com a aplicação de um campo magnético externo, 1,0 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm, evaporado em chapa de aquecimento a 40 °C e posteriormente retomado em fase móvel para determinação por HPLC-DAD.

#### 4.4.4 Construção das isotermas de adsorção

O efeito do aumento da concentração da solução de CHO no processo de adsorção foi estudado construindo-se as isotermas de adsorção e aplicando-se os modelos matemáticos descritos no Item 2.7. Para isso, 10,0 mg do polímero magnético foram adicionados a 10,0 mL de solução de CHO em CHCl<sub>3</sub> com concentrações crescentes (1,0 – 800,0 mg L<sup>-1</sup> CHO), levados a agitação em vortex por 60 segundos. Efetuou-se a separação das fases com o auxílio do campo magnético externo e o sobrenadante foi evaporado e recuperado em fase móvel para a determinação por HPLC-DAD.

#### 4.4.5 Influência do solvente de eluição

Realizou-se a avaliação do solvente de eluição do CHO após o processo de adsorção, em que com o auxílio de um campo magnético externo, o sobrenadante era

separado da fase sólida, evaporado e retomado em fase móvel, seguido da determinação por HPLC-DAD. Com a fase sólida, avaliou-se os solventes afim de eluir o CHO: metanol, etanol e acetonitrila. Para cada solvente, utilizou-se 2,0 mL, agitando-se durante 60, 120 e 180 segundos em vortex. Novamente um campo magnético externo foi utilizado para separar as fases e o sobrenadante foi levado para evaporar e posteriormente retomado em fase móvel, seguido de determinação por HPLC-DAD. Após a avaliação do melhor solvente de eluição e do tempo necessário para a obtenção da completa dessorção do CHO do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, efetuou-se a avaliação do efeito do volume do solvente. Para isso, realizou-se novamente o processo de adsorção conforme relatado acima e para os experimentos de dessorção utilizou-se 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,3 e 0,2 mL de etanol, durante 180 segundos de agitação em vortex, seguido de filtragem e evaporação do solvente, retomada em fase móvel e determinação por HPLC-DAD.

#### 4.4.6 Avaliação da seletividade do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP para CHO

Para avaliar a seletividade do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, ou seja, o efeito de impressão química, avaliou-se a adsorção com emprego de uma solução de CHO/estradiol, CHO/5- $\alpha$ -colestano, CHO/7-dehidrocolesterol no Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e no Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP. Estes experimentos foram realizados utilizando 10,0 mg do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, agitados durante 60 segundos, com 10,0 mL de uma solução binária na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de CHO e interferente em CHCl<sub>3</sub>. Após esta etapa, os sobrenadantes foram evaporados a 40 °C e recuperados em fase móvel para a determinação por HPLC-DAD. O mesmo procedimento foi realizado com o Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP. Com os resultados obtidos, foram determinados os parâmetros; coeficiente de distribuição (K<sub>d</sub>), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k'). O coeficiente de distribuição do analito e interferente é calculado a partir da seguinte equação:

$$K_d = \left[ \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] * \frac{V}{m} \quad \text{Equação 14}$$

Em que C<sub>i</sub> e C<sub>f</sub> (mg L<sup>-1</sup>) representam a concentração inicial e final; V (mL) o volume da solução; m (g) a massa do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP. Os valores de K<sub>d</sub> fornecem o

grau de retenção do analito e o interferente no Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP e, valores maiores de K<sub>d</sub> para o analito indicam o efeito de impressão química.

A partir do K<sub>d</sub> é possível estimar o coeficiente de seletividade, definido como a relação entre o coeficiente de distribuição para os analitos e o coeficiente de distribuição para os interferentes (Equação 15), fornecendo um indicativo da seletividade do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP em relação a um determinado analito.

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

Para fazer a comparação dos valores de k entre o Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e o Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP, ou seja, o coeficiente de seletividade relativo (k'), a Equação 16 é empregada. Os valores de k', refletem a magnitude do efeito de impressão sobre o MIP. Esta equação permite uma estimativa do efeito da impressão na seletividade.

$$k' = \frac{K_{MIP}}{K_{NIP}} \quad \text{Equação 16}$$

#### 4.4.7 Determinação dos parâmetros analíticos

Com as melhores condições de adsorção e eluição, avaliou-se o desempenho do método analítico com a construção de duas curvas analíticas, a primeira delas, submetendo soluções padrões de CHO às etapas de adsorção e eluição para posterior injeção no HPLC-DAD em fase móvel. A segunda, com a injeção direta das soluções padrões de CHO recuperados em fase móvel no HPLC-DAD. Com a obtenção da equação da reta de ambas as curvas analíticas, calculou-se o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), de acordo com a IUPAC (Equações 16 e 17, respectivamente) (LONG E WINEFORDNER, 1983). Em que *std* é o desvio padrão da leitura de dez brancos e *m* o coeficiente angular da curva analítica.

$$LD = \frac{3std}{m} \quad \text{Equação 16}$$

$$LQ = \frac{10std}{m} \quad \text{Equação 17}$$

Ainda, a precisão intradia e interdia foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR) para dez réplicas autênticas de amostras submetidas ao procedimento de adsorção e eluição nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> de CHO.

#### 4.4.8 Aplicação do método proposto em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de leite bovino integral UHT (*ultra high temperature*) adquirida em supermercado local, na cidade de Londrina – PR. Para isso, as amostras passaram por um procedimento inicial de saponificação, seguindo metodologia de Bligh e Dyer (1959), relatada por Gunnlaugsdottir e Ackman (1992). Para a saponificação, 10,0 g de amostra foram pesadas em um erlenmeyer de 125,0 mL, onde foram adicionados 8,0 mL de solução de hidróxido de potássio aquoso (KOH, 50,0 %) e 12,0 mL de etanol. O erlenmeyer foi levado a um banho termostático com agitação (140 bpm) a 40 °C por 10 minutos. Decorrido o tempo, a amostra saponificada foi levada para um funil de decantação, onde foram adicionados 30,0 mL de CHCl<sub>3</sub>, a mistura foi agitada manualmente e deixada para repousar até separação das fases orgânica e aquosa. Após a separação, 10,0 mL de fase orgânica foram coletados e submetidos ao procedimento de extração com 10,0 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, agitando em vortex por 60 segundos. Fase sólida e fase líquida foram separadas com a aproximação do campo externo magnético e a fase sólida foi levada ao procedimento de eluição, utilizando 0,5 mL de etanol agitando por 180 segundos em vortex, seguido de filtração e evaporação do solvente, retomada 1,0 mL em fase móvel e determinação por HPLC-DAD. Com o intuito de averiguar a exatidão do método proposto, teste de adição e recuperação de padrão foi empregado. Para tal, essas amostras B e C de leite foram dopadas com quantidades conhecidas de CHO e submetidas ao protocolo de saponificação, extração e eluição.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS

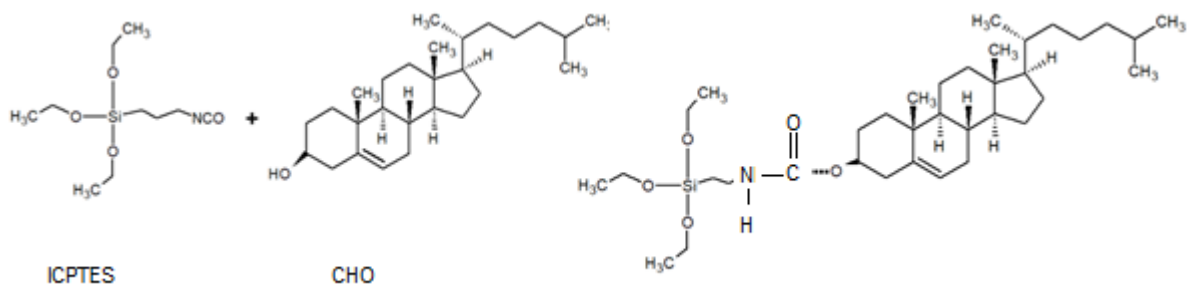
Inicialmente realizou-se um estudo das características químicas, físicas e morfológicas dos materiais sintetizados: óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), óxido de ferro com sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ), óxido de ferro com sílica/polímero molecularmente impresso ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ ) e óxido de ferro com sílica/polímero não impresso ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ ).

#### 5.1.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)

A fim de verificar a presença de grupos funcionais característicos dos materiais de partida nos materiais finais, empregou-se espectroscopia vibracional no infravermelho com reflexão total atenuada (ATR - FTIR).

Inicialmente, realizou-se a análise do CHO (molécula molde), do ICPTES (3-triethoxisilil propil isocianato - monômero funcional) e do produto dessa reação, conforme mostrado na Figura 11.

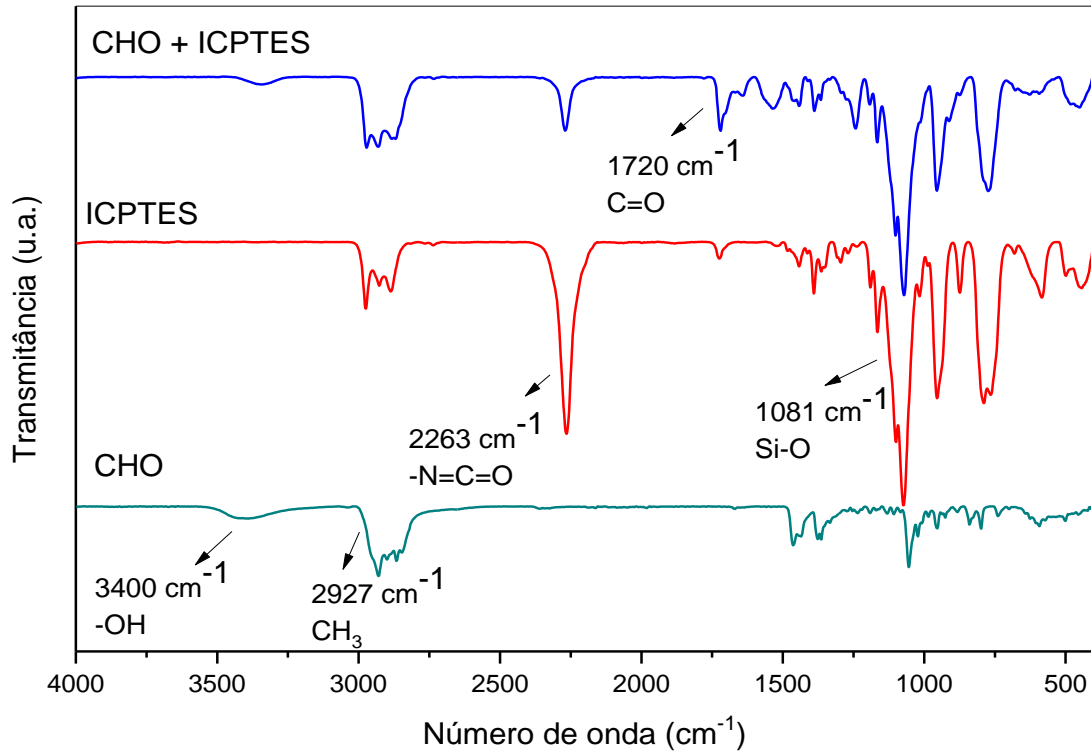
**Figura 11** - Esquema da reação entre o monômero funcional e a molécula molde



Fonte: o autor

Os espectros são apresentados na Figura 12.

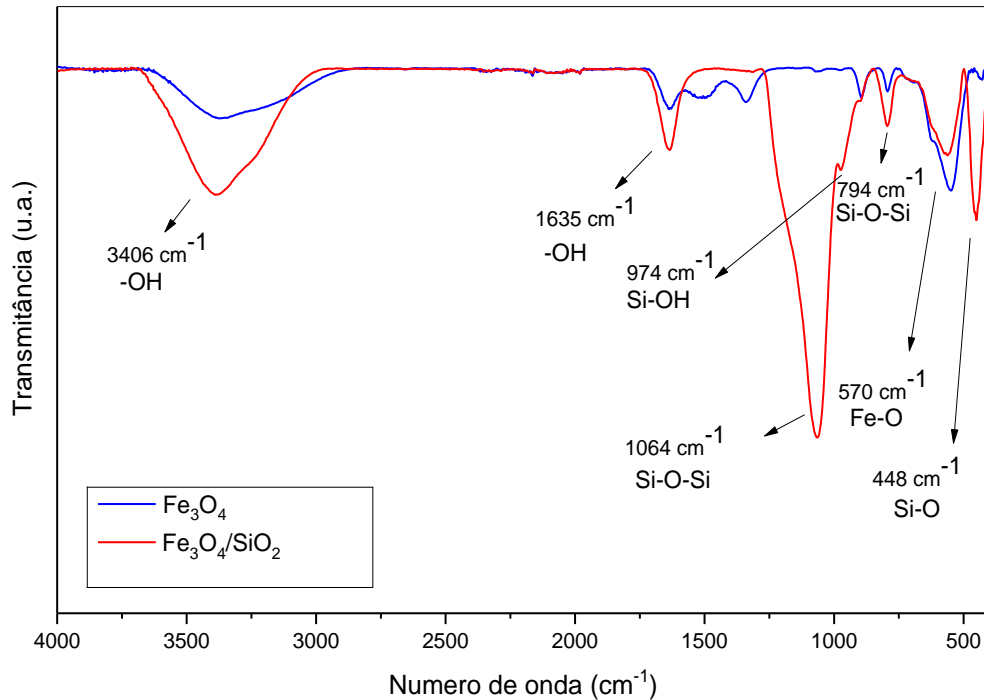
**Figura 12** - Espectros de ATR da molécula molde (CHO), monômero funcional (ICPTES) e do complexo formado entre o CHO e o ICPTES



Fonte: o autor

Para o espectro do ICPTES, a banda em  $2263 \text{ cm}^{-1}$  é referente ao grupamento isocianato e em  $1081 \text{ cm}^{-1}$  referente a ligação entre silício e oxigênio. A molécula molde apresenta as bandas referente ao grupo OH em  $3400 \text{ cm}^{-1}$  e as ligações C-H em  $2927 \text{ cm}^{-1}$ . Após a formação do produto CHO-ICPTES, em  $1720 \text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda referente ao grupo carbonila da ligação de uretano formada durante a reação, ausente na molécula de CHO, além da diminuição da intensidade das bandas da molécula molde (grupamento OH) e do monômero funcional (isocianato), evidenciando que a reação ocorreu (GÜNEY e GÜNEY, 2017; KI et al., 2002).

Após a obtenção do produto da reação entre o monômero funcional e a molécula modelo, preparou-se o óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e, posteriormente, a incorporação da sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ). Os espectros de ATR-FTIR são apresentados na Figura 13.

**Figura 13** - Espectros de ATR-FTIR do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 

**Fonte:** o autor

O espectro de infravermelho do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou os principais modos de vibração esperados para o material. As bandas de absorção na região de  $3406 \text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento vibracional dos grupos OH pertencentes às hidroxilas estruturais e as moléculas de água na superfície do material e a banda em  $1635 \text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuída a deformação angular das moléculas de água que estão na superfície do material (CUNHA et al., 2012).

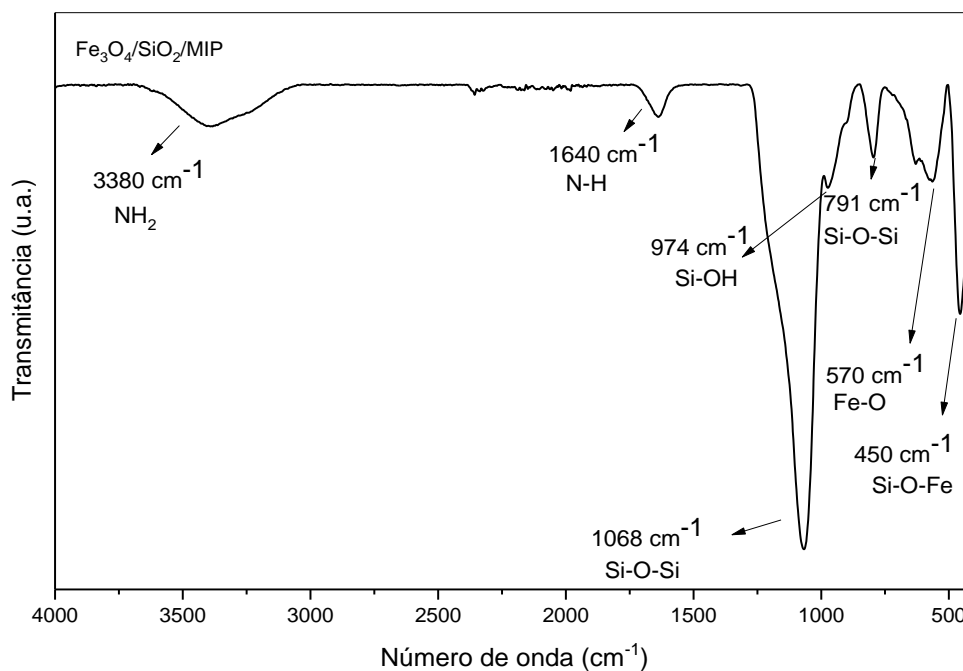
A banda em  $570 \text{ cm}^{-1}$  é referente a vibração Fe-O-Fe, confirmando a formação de óxido de ferro. Destaca-se que esta banda é preservada nos espectros dos materiais sintetizados sobre o núcleo de magnetita, indicando que a composição do óxido de ferro não sofre alterações, mesmo com as etapas seguintes de síntese (KARIMI, RANJBAR e AKBARPOOR, 2016; WANG et al., 2009).

Após a inserção da sílica no material, há o aparecimento de novas bandas referentes as interações entre o silício e o óxido de ferro, como é o caso da banda em  $448 \text{ cm}^{-1}$ , proveniente da deformação da ligação Si-O-Fe (KHOSROSHAHI e GHAZANFARI, 2012). As bandas em  $1064 \text{ cm}^{-1}$  e  $794 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídas aos estiramentos assimétricos e simétricos das ligações Si-O-Si. Ainda, em  $974 \text{ cm}^{-1}$

observa-se um pequeno ombro, atribuído o estiramento simétrico Si-OH (MENDONÇA et al., 2019).

Com a polimerização do MIP na superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (Fig. 14), o qual foi baseado na adição de CHO-ICPTES e TEOS ao meio reacional, observou-se como esperado, o aumento da intensidade da banda em  $1064\text{ cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos assimétricos Si-O-Si, em função do maior número dessas ligações devido ao uso de tetraetoxisilano (TEOS) na síntese do polímero (KARIMI, RANJBAR e AKBARPOOR, 2016; SU et al., 2015). Ainda, observa-se a banda em  $450\text{ cm}^{-1}$ , proveniente da deformação da ligação Si-O-Fe, a banda em  $791\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos estiramentos simétricos das ligações Si-O-Si e o pequeno ombro em  $974\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento simétrico Si-OH (MENDONÇA et al., 2019).

**Figura 14** - Espectros de ATR do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



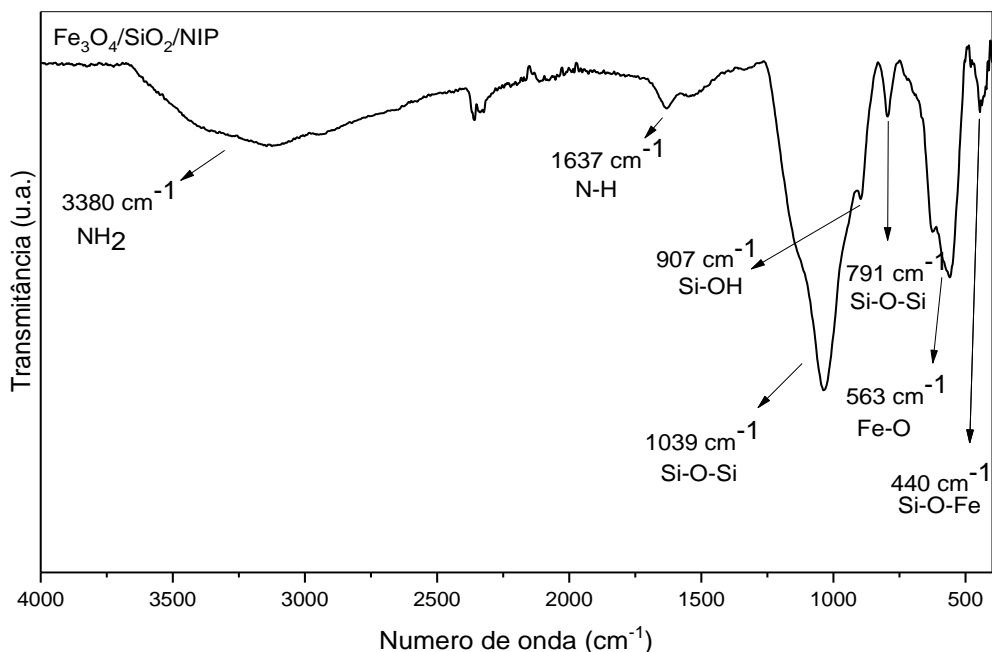
**Fonte:** o autor

Como mencionado, após a reação de polimerização na superfície, ocorre a formação de uma ligação de uretano, entre a molécula molde (CHO) e o monômero funcional 3-triethoxysilil propil isocianato, que é termicamente clivável (Figura 11). Para remover as moléculas de CHO ligadas covalentemente ao ICPTES e impressas na rede polimérica, as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foram aquecidas a  $180\text{ }^\circ\text{C}$  em uma mistura de dimetilsulfóxido e água, permitindo a clivagem da ligação de uretano e

resultando em um grupo amino (essa reação pode ser constatada na Figura 8). Observa-se a ausência da banda referente ao grupo carbonila (presente no espectro do produto da reação CHO+ICPTES em  $1720\text{ cm}^{-1}$ , Figura 12). Ainda, a presença da banda de  $\text{-NH}_2$  em  $3380\text{ cm}^{-1}$  e da banda de N-H em  $1640\text{ cm}^{-1}$  indicam a introdução bem sucedida desse grupo funcional no material (GÜNEY e GÜNEY, 2017; KARIMI, RANJBAR e AKBARPOOR, 2016; WANG et al., 2016).

Para o material sem a impressão da molécula molde,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  (Figura 15), observa-se, como esperado, bandas similares as obtidas no material impresso, devido a utilização do monômero funcional 3-aminopropiltrióxissilano (Figura 10), substituindo o complexo formado entre o CHO e o 3-triethoxissilil propil isocianato. Em  $3380$  e  $1637\text{ cm}^{-1}$  verifica-se as bandas referente ao grupo funcional amino inserido no material através do monômero funcional (3-aminopropil) trióxissilano. Observa-se ainda, a presença da banda referente ao óxido de ferro em  $563\text{ cm}^{-1}$ , a banda em  $440\text{ cm}^{-1}$  proveniente da deformação da ligação Si-O-Fe, a banda em  $791\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos estiramentos simétricos das ligações Si-O-Si, a banda em  $1039\text{ cm}^{-1}$  referente aos estiramentos assimétricos Si-O-Si e o pequeno ombro em  $791\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento simétrico Si-OH (MENDONÇA et al., 2019; GÜNEY e GÜNEY, 2017).

**Figura 15 - Espectro de ATR do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$**



Fonte: o autor

### 5.1.2 Fisiossorção de gás N<sub>2</sub>

As características texturais do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP foram avaliadas pelo método de Brunette-Emmet-Teller (BET) para a área específica e método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) para distribuição dos tamanhos de poros. Os resultados obtidos na análise da área específica, volume de poro e diâmetro de poro dos materiais sintetizados estão reunidos na Tabela 1.

O Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresenta diâmetro médio de poro reduzido comparado aos materiais Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP, bem como menor volume de poro, caracterizando-o com baixa porosidade. Porém, devido ao fato de ser um material nanoestruturado, apresentou área específica elevada (BEHRENS, 2011).

**Tabela 1** - Área específica, volume de poro e diâmetro de poro para o Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP

Material	Área específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume de poro (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Diâmetro de poro (nm)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	151,04	0,32	7,52
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub>	115,36	0,55	15,67
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /MIP	163,18	0,66	15,79
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /NIP	66,09	0,21	1,36

Fonte: o autor

Observa-se que após o revestimento de sílica (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>), a área específica diminui em relação ao Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, devido a hidrólise do silicato presente no metassilicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) acompanhado por reações de condensação e policondensação para formar a rede polimérica à base de sílica. O processo de modificação da superfície por silanização é uma reação muito complexa, em que a reação entre um precursor silano (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) e um material sólido (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) não envolve um único mecanismo e muitos intermediários diferentes são possíveis. Acredita-se que os grupos silanóis, formados pela hidrólise do metassilicato de sódio, reagem entre si por meio de reações de condensação e com as ligações Fe-O para formação da rede polimérica formando ligações Si-O-Fe, conforme apresentado nos espectros ATR-FTIR (Figura 13). Presume-se também, que o emprego do metassilicato de sódio, um precursor de silano pouco volumoso, aumenta a velocidade das reações de hidrólise levando à formação de cadeias poliméricas lineares e compactas resultando num

material com menor área específica (ALFAYA e KUBOTA, 2002; SHARAFI et al., 2018).

Após a polimerização ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ ), uma nova rede polimérica foi formada, catalisada por ácido (HCl), onde os átomos de silício são providos pelo TEOS e a sua fração etoxi é hidrolisada para que, na sequência reaja com os grupos -OH da superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , formando uma ligação Si-O-Si. Ainda, esses grupos silanóis ligam-se ao produto (CHO-ICPTES) da reação do monômero funcional e CHO (posteriormente removido por clivagem química) que, por ser volumoso, diminui as reações de hidrólise e condensação, levando a formação de um maior número de ramificações na rede polimérica e, por consequência, a um material com maior porosidade e área específica e essa nova rede polimérica aumenta a área específica do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  em comparação ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

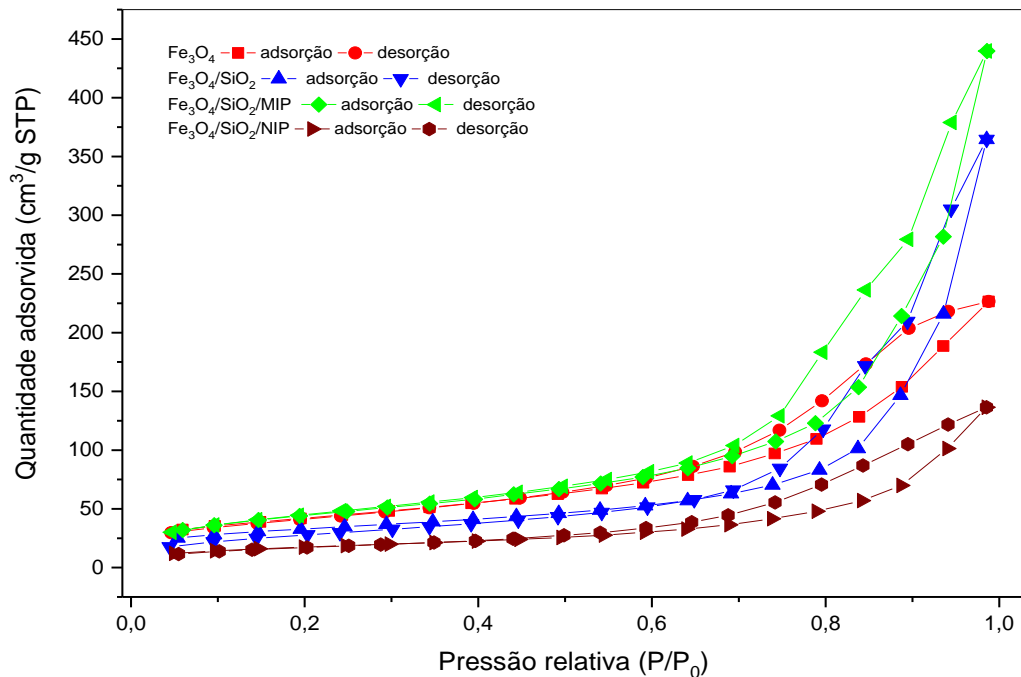
A diminuição de todos os dados texturais observados para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  é explicada pela substituição do produto CHO+ICPTES pelo monômero APTMS. Idealmente, a fração etoxi do APTMS é hidrolisada e reage com os grupos -OH da superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  para formação de uma ligação Si-O-Si com o TEOS, enquanto o grupo amino ficaria livre para posterior ligação com o CHO. No entanto, a presença da água e do catalisador ácido no meio reacional podem levar a protonação dos grupos amino que passam a competir pelos grupos hidroxila da superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , levando à formação de um material mais reticulado, com menor área específica e ao fechamento dos poros (WHITE e TRIPP, 2000). Ainda, o APTMS tem uma solubilidade maior em MeOH, se comparado ao produto CHO+ICPTES (CHO é pouco solúvel em solventes polares, devido a sua cadeia carbônica) e como consequência da sua maior interação com o monômero funcional, torna-se mais difícil remover o solvente porogênico da rede polimérica, fazendo com que o diâmetro e o volume dos poros seja menor (OLIVEIRA, 2015; PRETE, 2018).

Os valores de diâmetro dos poros obtido para os materiais (com excessão do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ ), são classificados segundo a IUPAC, como mesoporosos, por possuírem tamanho entre 2 e 50 nm e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  tem seus poros definidos como microporos (< 2 nm) (THOMMES et al., 2015).

As isotermas de adsorção e dessorção dos materiais são exibidas na Figura 16. O perfil das isotermas, classificadas segundo a IUPAC, são do tipo IV, e apresentam histerese tipo H3 (com dois ramos distintos, em que o inferior mostra a quantidade de gás adsorvida com o aumento da pressão relativa, enquanto o ramo

superior representa a quantidade de gás desorvida no processo de desorção) que aparece em pressão relativa alta, confirmando material mesoporoso. Esse tipo de isoterma é característica de sólidos mesoporosos, onde o processo de evaporação é diferente do processo de condensação (THOMMES et al., 2015; BEDIN et al., 2017).

**Figura 16** - Isotermas de adsorção e desorção do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$



**Fonte:** o autor

Comparando os dados do presente trabalho com os valores obtidos em trabalhos anteriores no grupo de pesquisa para materiais semelhantes, Diniz e Tarley (2015), sintetizaram partículas de óxido de ferro com área específica de  $41,69 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e, após o recobrimento com sílica, obtiveram área de  $28,51 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , valores menores aos obtidos no presente estudo.

Clausen, Visentainer e Tarley (2014), sintetizaram um polímero híbrido baseado em ácido metacrílico/tetraetoxisilano nas proporções 6:1 e 1:5 (mol/mol) para a extração de CHO em amostras de leite e obtiveram uma área específica de  $42,44$  e  $178,50 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  respectivamente. Ainda, o volume do poro obtido pelos autores foi menor para todos os materiais sintetizados quando comparado ao presente estudo,  $5,47$  e  $1,51 \text{ nm}$ , para ácido metacrílico/tetraetoxisilano nas proporções 6:1 e 1:5, respectivamente. Apesar do polímero 1:5 apresentar área específica muito maior, o

polímero 6:1 apresentou maior capacidade sortiva e seletividade para CHO proporcionado pelo monômero ácido metacrílico e, por esse motivo, foi utilizado nos ensaios de extração em fase sólida.

Quando comparado a polímeros orgânicos para CHO sintetizados pelo método em *bulk*, o valor obtido para a área específica do material sintetizado nesse trabalho é maior. Yavuz et al., (2007) obtiveram um polímero para CHO com área de  $31,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , enquanto Odabaşı et al. (2018), obtiveram um polímero com área de  $36,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

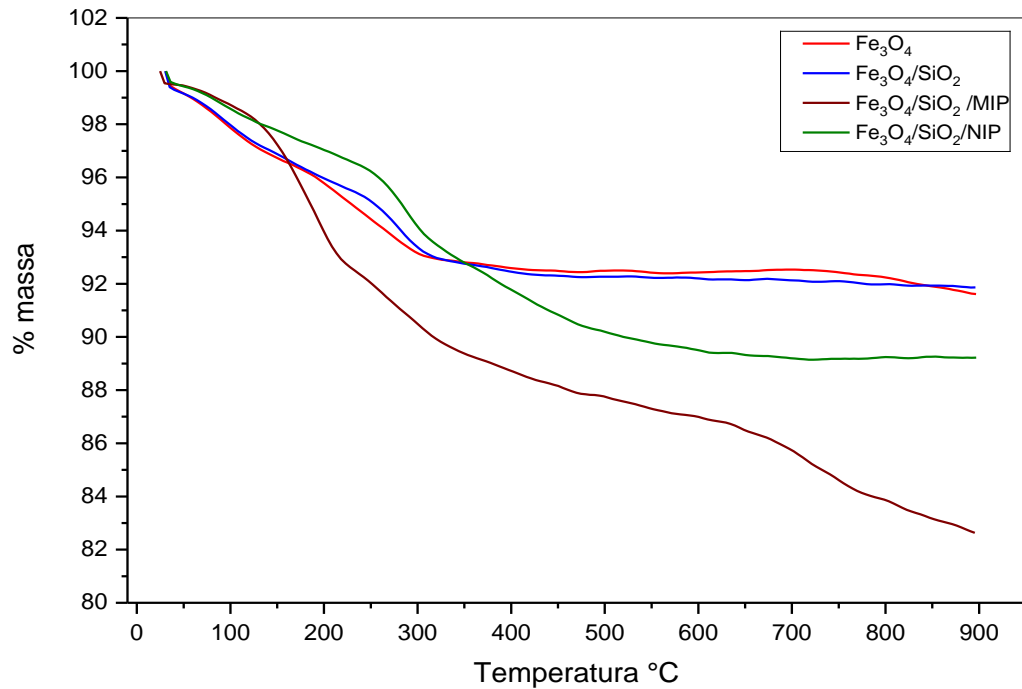
Outros trabalhos que utilizaram MIP magnético apresentaram valores semelhantes, como é o caso de Xie et al. (2015) (MIP magnético para ácido protocatecuico) com área superficial de  $119,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , volume de poro de  $0,13 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e diâmetro de poro de 3,2 nm. KHAN et al., (2018), sintetizaram um polímero magnético para a ametrina com área específica de  $50,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e polímero não impresso magnético  $26,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

### 5.1.3 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica possibilitou estudar a estabilidade térmica dos materiais sintetizados e a compreensão da incorporação dos materiais a cada passo de síntese. As curvas termogravimétricas para cada material estão reunidas na Figura 17.

Para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , a perda de massa inicial em temperaturas inferiores a  $150^\circ \text{C}$ , é atribuída à eliminação de água fisicamente adsorvida na superfície dos materiais (SHI et al., 2014). A segunda perda de massa, entre  $210$  e  $320^\circ \text{C}$  é atribuída ao processo de mudança de fase que ocorre no  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Nessa faixa de temperatura, em  $270^\circ \text{C}$ , o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  passa a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (conversão da magnetita em maghemita) e em  $320^\circ \text{C}$  o  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$  passa a  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (conversão da maghemita a hematita), alterando a estrutura cristalina e as propriedades magnéticas do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (ALAMRI et al., 2018).

**Figura 17** - Curvas termogravimétricas para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$



Fonte: o autor

As curvas termogravimétricas e a porcentagem de perdas de massa para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  são muito semelhantes, indicando que uma pequena quantidade de sílica foi incorporada ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , que causou uma fraca influência na perda de massa do material na faixa referente a mudança de fase do óxido de ferro (210 °C a 320 °C). Esse revestimento de sílica é termicamente estável e as perdas de massa para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  são provenientes do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Pode-se observar a primeira perda de massa, referente à evaporação da água até 150 °C; a segunda perda de massa é visualizada entre 210 °C e 320 °C, referente à conversão de magnetita em maghemita e, em seguida, em hematita, levemente mais branda em comparação ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , devido a proteção da incorporação da sílica. A última perda de massa é tênue e acontece acima de 350 °C e é atribuída à perda dos grupos silanos da superfície da sílica; esta perda não ocorre a uma temperatura específica, uma vez que os grupos de silano se decompõem lentamente na superfície da sílica (NASCIMENTO, OLIVEIRA e BORGES, 2019; LI et al., 2010).

A curva termogravimétrica para  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  apresenta uma primeira perda de massa em temperatura inferior a 130 °C, relativo à água da superfície. Na faixa de 130 – 500 °C, uma queda acentuada de massa pode ser atribuída às mudanças de fase do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita-maghemita-hematita, conforme relatado anteriormente), à

decomposição térmica dos grupos amino (grupos funcionais responsáveis pela interação com o analito no processo de sorção) e à frações orgânicas ligadas a átomos de Si (grupos etoxi do monômero funcional). Acima de 500 °C, a perda de massa corresponde à desidratação completa das espécies de sílica, possivelmente devido à baixa reticulação da rede polimérica (BANAEI et al., 2015; KHOSROSHAHI e GHAZANFARI, 2012).

Adicionalmente, o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  mostrou-se menos estável termicamente que os demais materiais, com o início da degradação em 130 °C e uma perda de massa maior (17%) quando comparado aos demais materiais, que pode ser explicado pela maior quantidade de ramificações da rede polimérica. Considerando-se os dados discutidos na análise de fisiosorção de  $\text{N}_2$ , observa-se que esse material apresenta maior área específica, volume e diâmetro de poro, devido a essas propriedades, sua rede polimérica é menos reticulada e, portanto degrada mais rapidamente quando exposta ao aumento da temperatura (XIE et al., 2015).

O  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  apresenta uma primeira perda de massa, referente a água da superfície em temperatura inferior a 150 °C. Posteriormente, até 550 °C, ocorre a mudança de fase do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , a fração orgânica e os grupos aminos referentes ao monômero funcional sofrem decomposição térmica e acima dessa temperatura, grupos silanóis são completamente desidratados (KHOSROSHAHI e GHAZANFARI, 2012). A diferença de perda de massa entre o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  foi de 10 %, que pode ser atrelada a maior área específica e maior reticulação do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , conforme mencionado anteriormente.

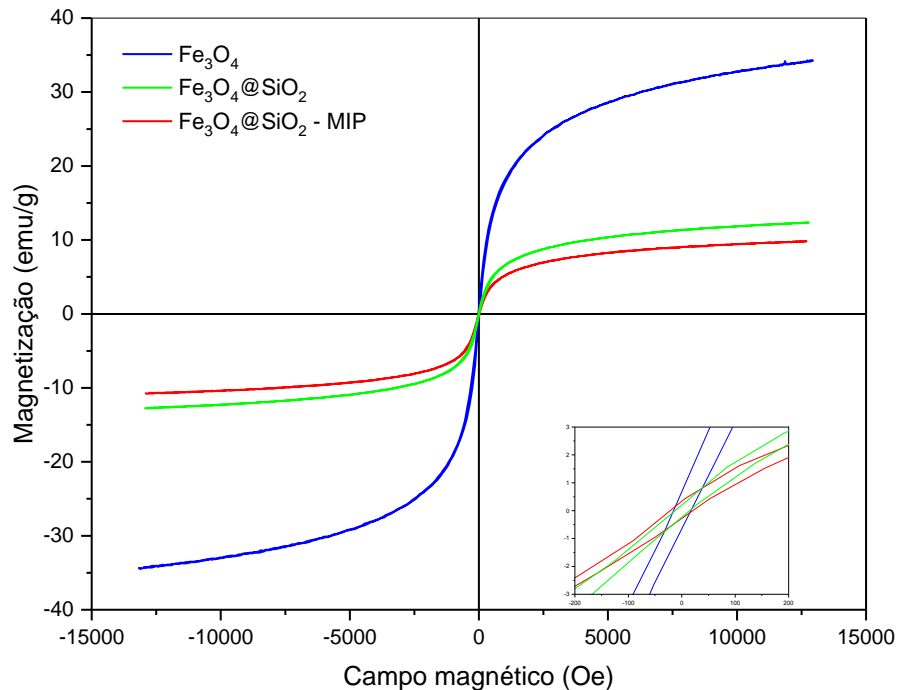
#### 5.1.4 Medidas de magnetização

As medidas de magnetização foram realizadas o monitoramento da presença de ferromagnetismo ou ferrimagnetismo nos materiais. Os materiais exibiram comportamento caracterizado como ferrimagnético, ou seja, seus momentos magnéticos se alinham fortemente na direção de um campo magnético externo e quando este é retirado, parte dos momentos magnéticos volta a se desalinhar, e outra parte mantém o alinhamento obtido quando da aplicação do campo magnético (KUDR et al., 2017).

Como pode ser observado no detalhe da Figura 18, os materiais exibiram uma pequena histerese (a magnetização não retorna ao zero quando retirado o campo

magnético externo), remanência (magnetismo residual na amostra depois que o campo é aplicado ao material ferrimagnético) e coercitividade (intensidade de campo magnético reverso necessário para que se elimine o campo magnético remanescente) (WU, HE e JIANG, 2008). Esses valores são apresentados na Tabela 2.

**Figura 18** - Curvas de magnetização do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ . No detalhe, é possível observar a pequena histerese obtida para cada um deles



Fonte: o autor

**Tabela 2** - Parâmetros magnéticos obtidos pela análise de medida magnética

	Magnetização de saturação (emu/g)	Remanência (emu/g)	Coercitividade (Oe)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	34	0,63	18
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	12,2	0,20	14
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	9,7	0,19	21

Os valores de magnetização de saturação (Tabela 2) podem ser considerados uma medida da força magnética máxima. Observa-se uma diminuição da força magnética do núcleo de óxido de ferro após cada etapa de síntese.

Esse decréscimo no valor de magnetização aponta para a presença da sílica e da polimerização na superfície do óxido de ferro, causando um efeito de blindagem, devido ao fato de que se sintetizados e analisados separadamente, a sílica e o

polímero não possuem características ferrimagnéticas (LI et al., 2009; MAK YU et al., 2019; YUAN et al., 2012; ZHAO et al., 2008).

Outro fator que pode ser responsável pela redução da magnetização é que a sílica se liga à superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por meio da ligação química Fe-O-Si. O momento magnético dos íons de ferro ligados ao silício desaparece com a formação dessas ligações, levando a uma diminuição do ferrimagnetismo, evidenciando a presença de sílica no material (ALAMRI et al., 2018; FAN et al., 2018).

Para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , a magnetização sofre mais um pequeno decréscimo, apontando que a polimerização ocorreu na superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e que os grupos silano adicionados nessa etapa de síntese causaram novamente um efeito de blindagem, apesar de não ter reagido com a superfície do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , como ocorreu no revestimento com sílica. O polímero atuou com uma camada de proteção do núcleo magnético, causando a queda da magnetização (ALAMRI et al., 2018).

Apesar da considerável diminuição da magnetização, o material utilizado durante os experimentos,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , permaneceu fortemente ferrimagnético e era isolado usando um campo magnético externo em poucos segundos, como é possível verificar nas imagens da Figura 19.

**Figura 19** - (a) campo magnético aproximado do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e (b) durante o processo de sorção



Fonte: o autor

### 5.1.5 Fluorescência de Raios X

A composição química dos materiais sintetizados foi determinada pela técnica de fluorescência de raios X (FRX) com a determinação qualitativa e quantitativa dos teores totais dos elementos químicos de número atômico maior que o sódio (Na), através da identificação e medida dos raios X característicos emitidos pelo material. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Elementos presentes no  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$

Material	Elemento (%)					
	Fe	Si	Mn	Ca	Cu	S
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	99,55	-	0,07	-	0,03	-
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	93,87	5,72	0,31	0,08	-	-
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	68,11	30,68	0,22	0,09	0,04	0,83
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$	93,40	6,24	0,25	0,08	-	-

Quantidades vestigiais dos elementos manganês (Mn), cálcio (Ca), cobre (Cu) e enxofre (S) encontrados em todos os materiais são provenientes de possíveis impurezas das vidrarias ou dos reagentes utilizados durante o processo de síntese. Os elementos oxigênio, carbono e nitrogênio, presentes nos materiais sintetizados não foram passíveis de quantificação, por possuir número atômico menor que o sódio.

Os valores obtidos para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mostram a predominância do ferro (Fe) na composição do material, conforme esperado, devido a composição desse material ser unicamente óxido de ferro (ZAYED et al., 2017).

Para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , observa-se o aparecimento de silício (Si), proveniente da incorporação da rede de sílica no  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Porém, a quantidade de Si comparada a de Fe é pequena, indicando que uma pequena quantidade de sílica foi incorporada a magnetita, formando uma rede de sílica compacta, corroborando com o que foi anteriormente discutido na análise termogravimétrica e análise textural.

O  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  apresenta uma proporção maior de Si na sua composição, devido ao uso do TEOS e do monômero funcional na sua síntese, apontando para a presença expressiva da rede polimérica impressa nesse material, em conformidade com o relatado nas análises anteriormente abordadas. Essa nova rede polimérica proporciona o aumento da área específica do material, diminui a saturação de

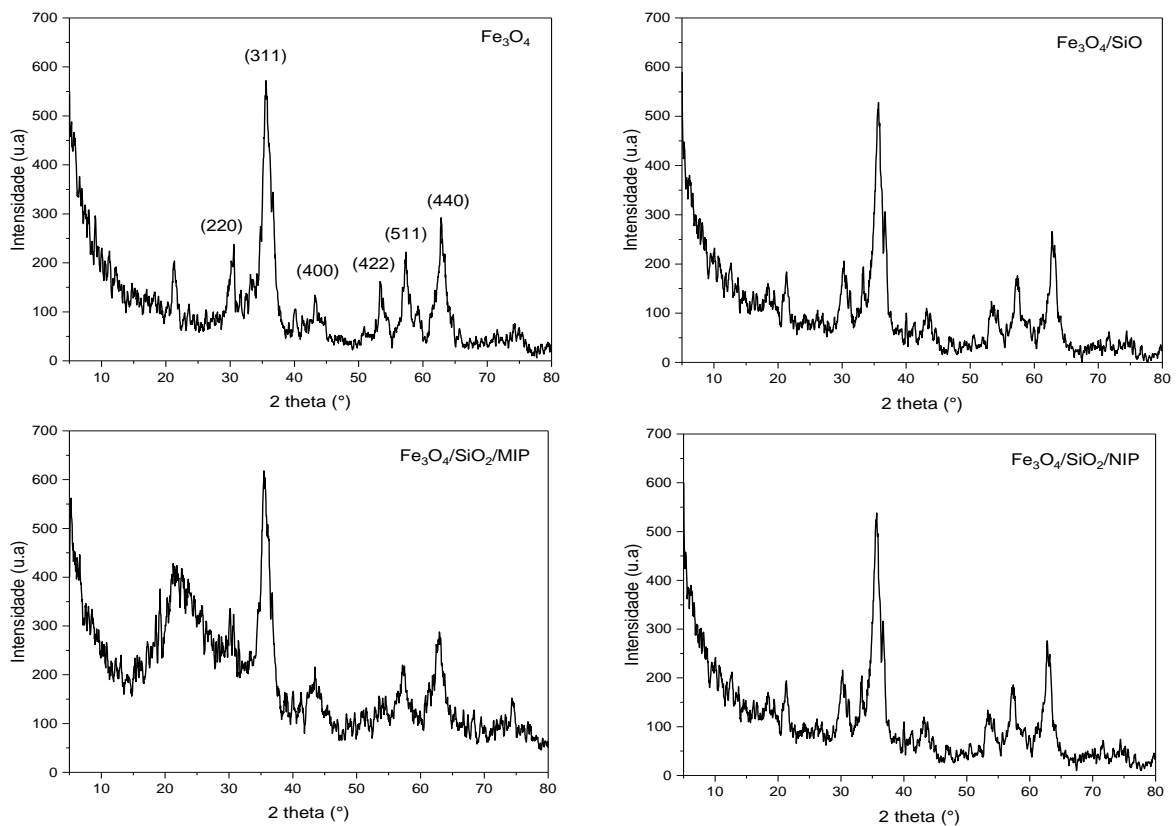
magnetização e tem maior degradação quando o material é exposto a um aumento de temperatura, como observado no resultado de TGA.

Analisando a composição do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , observa-se uma semelhança com os valores do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , mostrando que a rede polimérica nesse material é menor em comparação com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , justificando a diferença dos dados desse material obtidos na análise termogravimétrica e fisiossorção de nitrogênio.

### 5.1.6 Difração de raios X

As propriedades estruturais do óxido de ferro e do materiais sintetizados sob este, são analisadas pela difração de raios X (DRX), afim de elucidar a estrutura cristalina e, também para auxiliar na compreensão de suas propriedades. Os difratogramas são apresentados na Figura 20.

**Figura 20** - Difratogramas de raios X para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$



Fonte: o autor

O  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  exibe picos de reflexão intensos na região de 5 a  $80^\circ$ , característicos as fases de óxido de ferro. Os picos são observados em  $2\theta = 30,42$  (220),  $35,52$  (311),  $43,53$  (400),  $53,43$  (422),  $57,46$  (511),  $62,80$  (440) referindo-se aos índices de Miller (respectivamente), de acordo com o padrão de difração de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cristalino (JCPDS, arquivo 19-0629), confirmando a presença da fase magnetita (ARVAND, ERFANIFAR e ARDAKI, 2017).

O  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou padrões semelhantes ao material puro, com uma ligeira diminuição na intensidade dos picos característicos do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , devido a adição de sílica (MENDONÇA, et al., 2019). Porém, o halo característico à sílica amorfa em  $20^\circ < 2\theta > 30^\circ$  não é observado, indicando que a presença de sílica nesse material é pequena quando comparada ao óxido de ferro, corroborando com os dados obtidos na análise de FRX, que mostraram que uma pequena quantidade de sílica foi incorporada ao material.

Para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  as posições dos picos são novamente relativas ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , sem alterações nas posições, indicando que o procedimento de polimerização na superfície não causou alteração na estrutura cristalina do óxido de ferro (AHMAD, SIDDIQUI e AHMAD, 2019). Para esse material, a adição de compostos de silício (TEOS e os monômeros funcionais utilizados) causou o aparecimento do halo de sílica amorfa em  $20^\circ < 2\theta > 30^\circ$  e confirma o resultado do FRX que apontou esse material com maior quantidade de sílica.

O  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  apresentou características semelhantes ao difratograma do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , sem o halo referente a presença de sílica. Novamente esses dados estão em concordância com o obtido no FRX, que mostrou valores parecidos de quantidade de silício entre esses dois materiais.

#### 5.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  são mostradas na Figura 21. Como pode ser visualizado, as partículas possuem formato esférico e com tamanho variando de 10 a 25 nm.

Conforme discutido nos dados de fluorescência de raios X, difratometria de raios X e análise termogravimétrica, a quantidade de sílica incorporada na matriz de óxido de ferro foi pequena e as imagens de TEM do material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  foram similares ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figura 22). Ainda devido a reduzida quantidade de sílica, não foi

possível verificar a uma estrutura do tipo *core-shell* (núcleo-casca), caracterizada por um núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com imagem mais escura e a casca de  $\text{SiO}_2$  com imagem clara. Nas imagens obtidas, as regiões mais claras podem indicar a presença de sílica dispersa não ligada ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , sendo um indicativo de formação de uma estrutura interpenetrante (LI et al., 2010; OLIVEIRA, 2015).

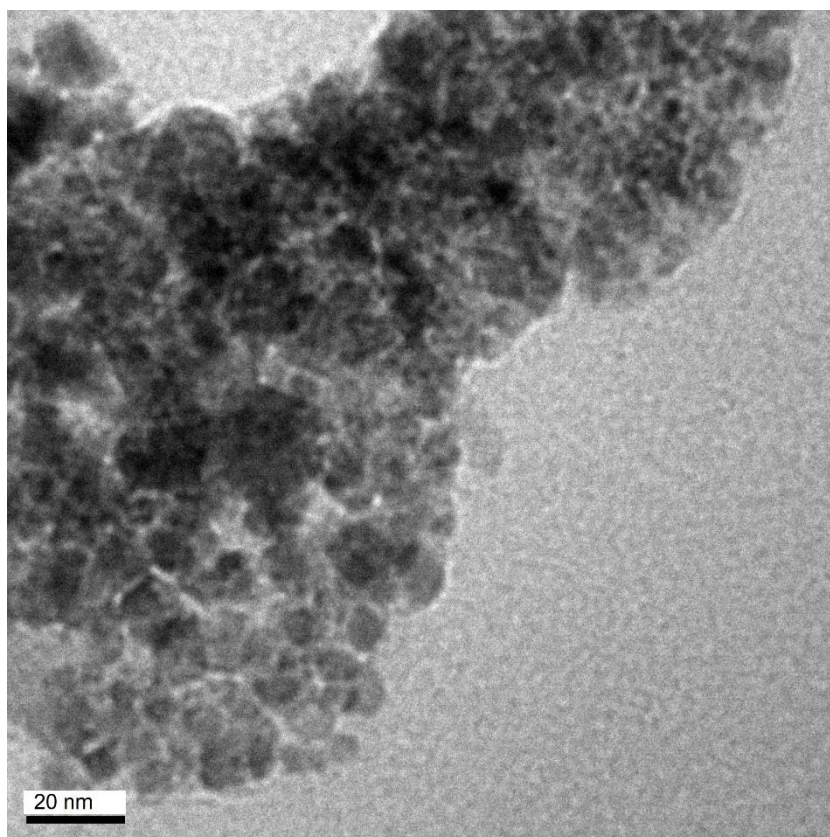
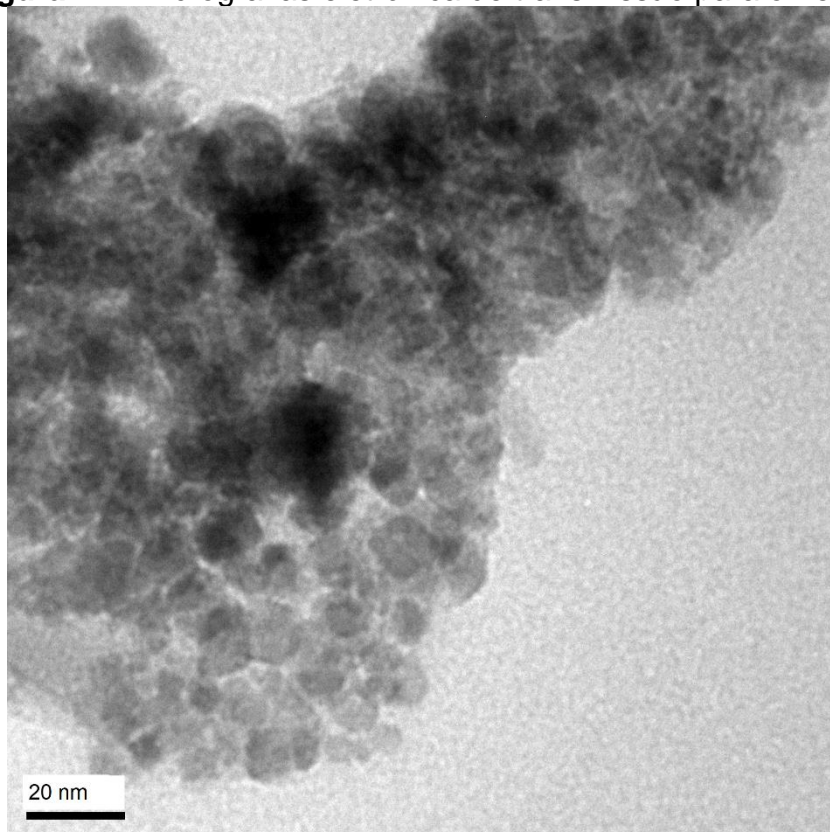
Para o material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , as imagens de TEM (Figura 23) revelam que partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estão menos agregadas e mais dispersas na rede de sílica, que agora está com uma maior quantidade em comparação com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Considerando a presença de grandes extensões de redes poliméricas isoladas de  $\text{SiO}_2$  no  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e que a síntese do material foi realizada na presença de um catalisador ácido, presume-se que essa rede de sílica apresente maior número de ramificações e maior porosidade e, por consequência, menor estabilidade térmica e maior área superficial corroborando os dados de análise térmica e análise textural.

O material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  (Figura 24), apresenta menores extensões de redes poliméricas isoladas de  $\text{SiO}_2$  e observou-se que as imagens de TEM são similares as do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e diferentes daquelas do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ . Os dados de fluorescência de raios X mostraram que esse material possui uma quantidade de silício muito parecida com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tornando sua rede polimérica semelhante a esse material e menor em comparação ao  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ .

É importante salientar que a estrutura obtida para o material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  não constituiu uma desvantagem em processos de sorção. Estruturas do tipo *core-shell* levam a formação de sorventes com formatos mais esféricos e uniformes, mas com poucos sítios de impressão química. No presente trabalho, foi obtido um nanocompósito constituído de partículas magnéticas dispersas numa rede de sílica molecularmente impressa, a qual possui um número maior de sítios impressos. Adicionalmente, estruturas interpenetrantes podem resultar na agregação, mas também em tamanhos de partícula diferentes, como é perceptível nas Figuras 21 a 24. Também, este tipo de estrutura com uma grande quantidade de óxido de ferro tornou as partículas do polímero magnético facilmente operadas por um campo magnético externo, devido a agregação do núcleo magnético, conforme resultado discutido na análise de medidas de magnetização (FAN et al., 2015).

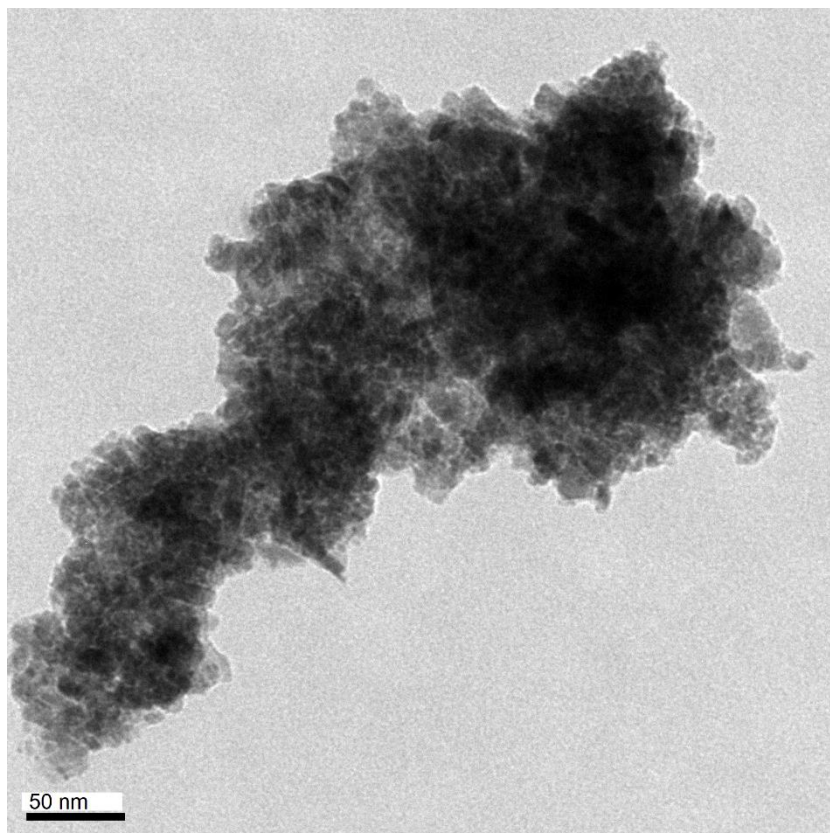
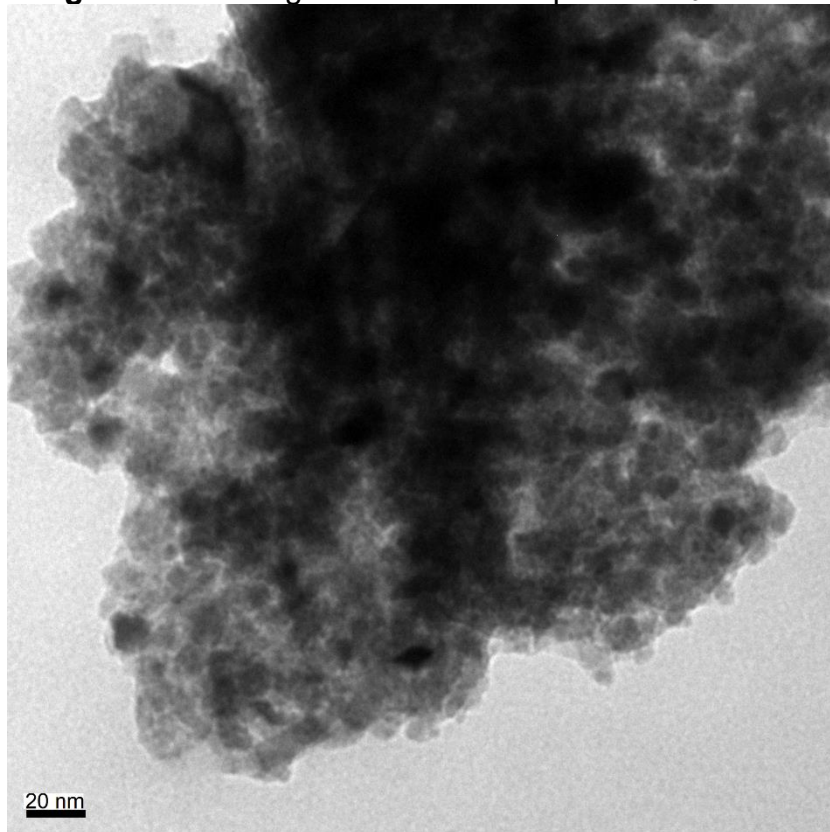
A seguir, as micrografias dos materiais são apresentadas.

**Figura 21** - Micrografias eletrônica de transmissão para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$



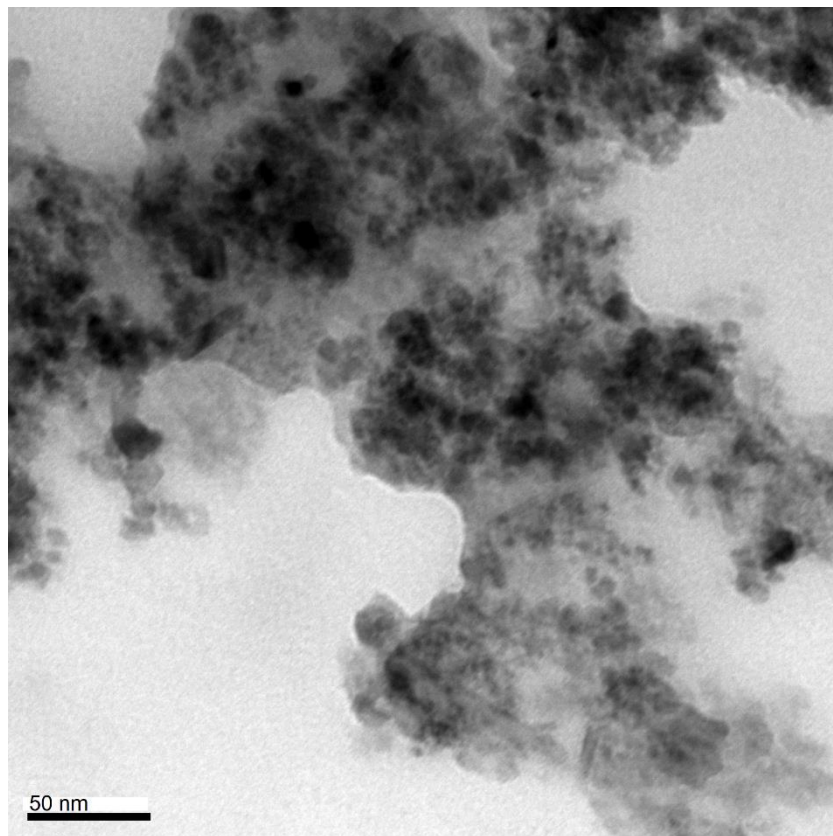
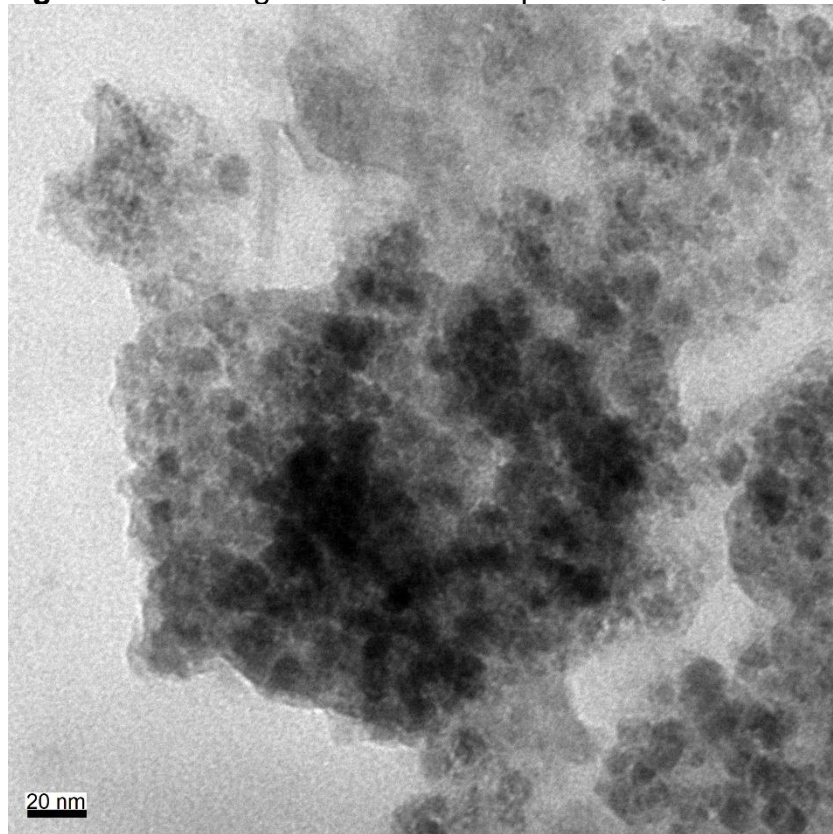
**Fonte:** o autor

**Figura 22** - Micrografias eletrônicas para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$



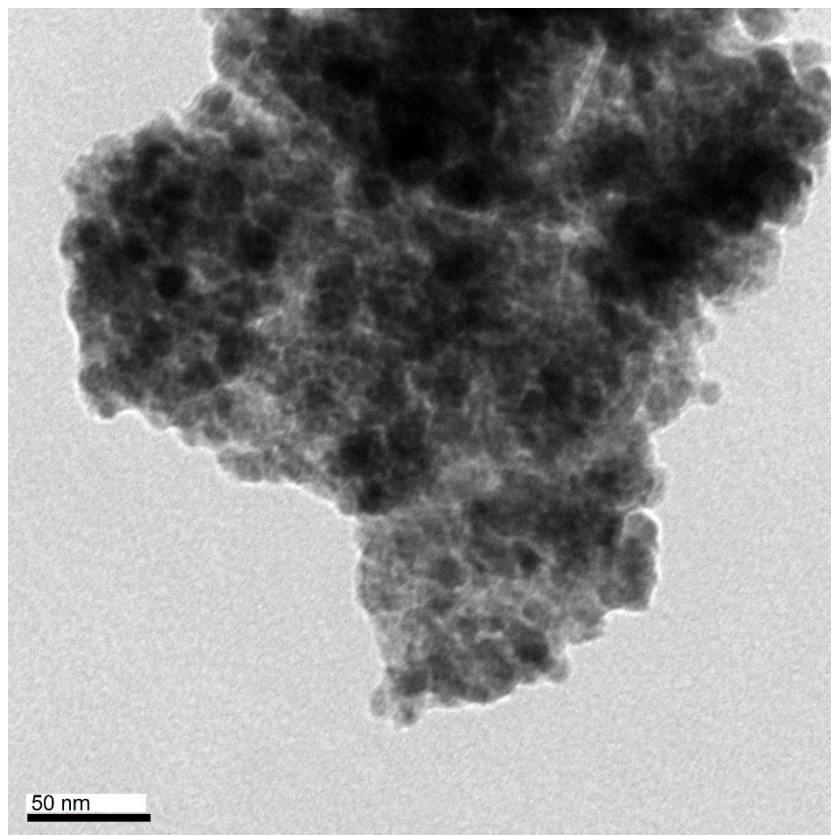
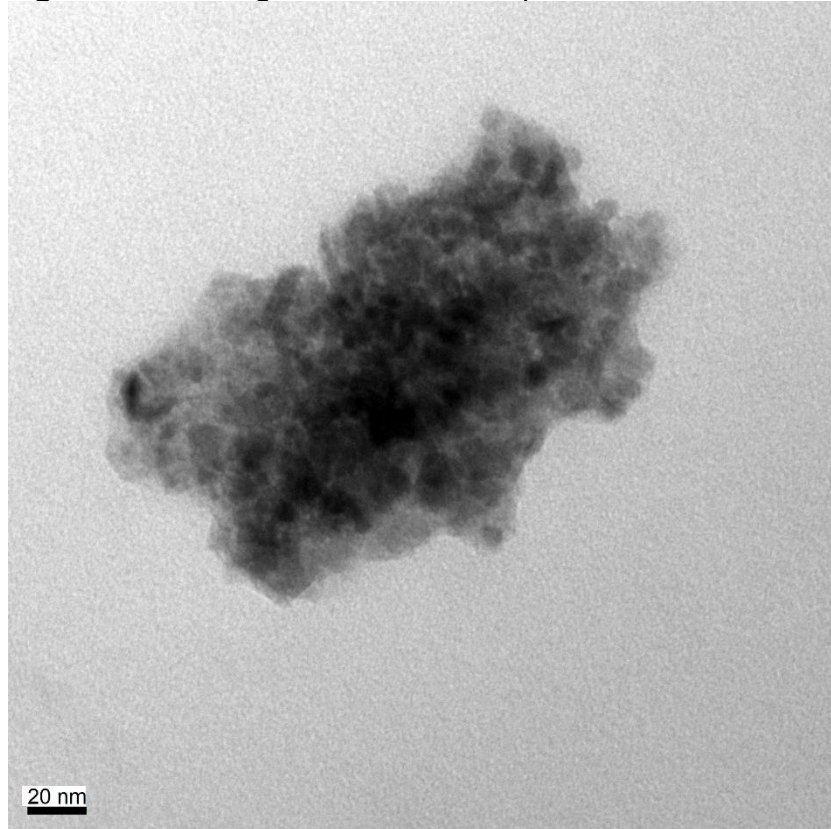
**Fonte:** o autor

**Figura 23** - Micrografias eletrônicas para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



**Fonte:** o autor

**Figura 24** - Micrografias eletrônicas para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$



**Fonte:** o autor

### 5.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

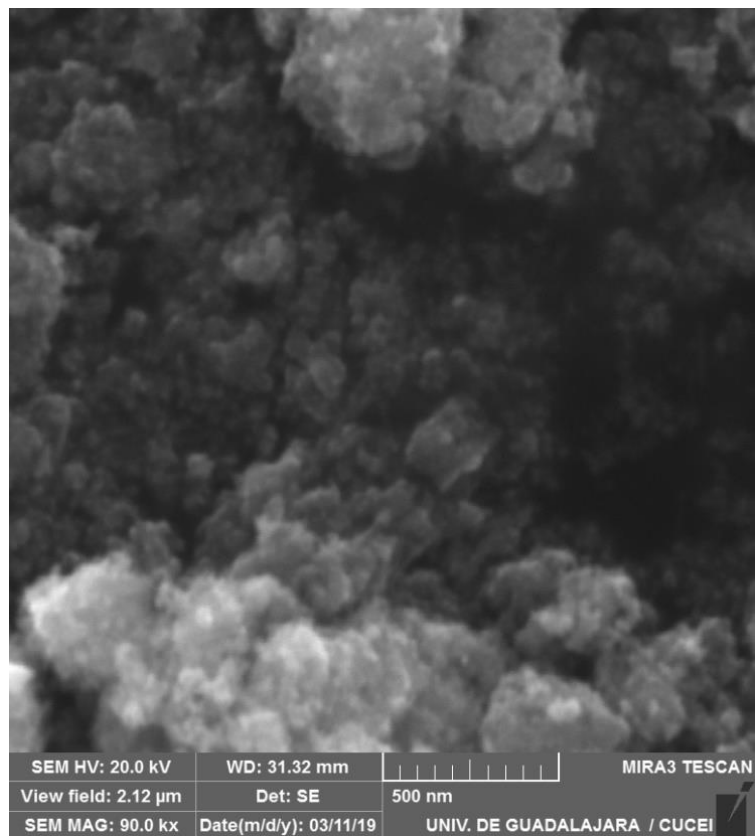
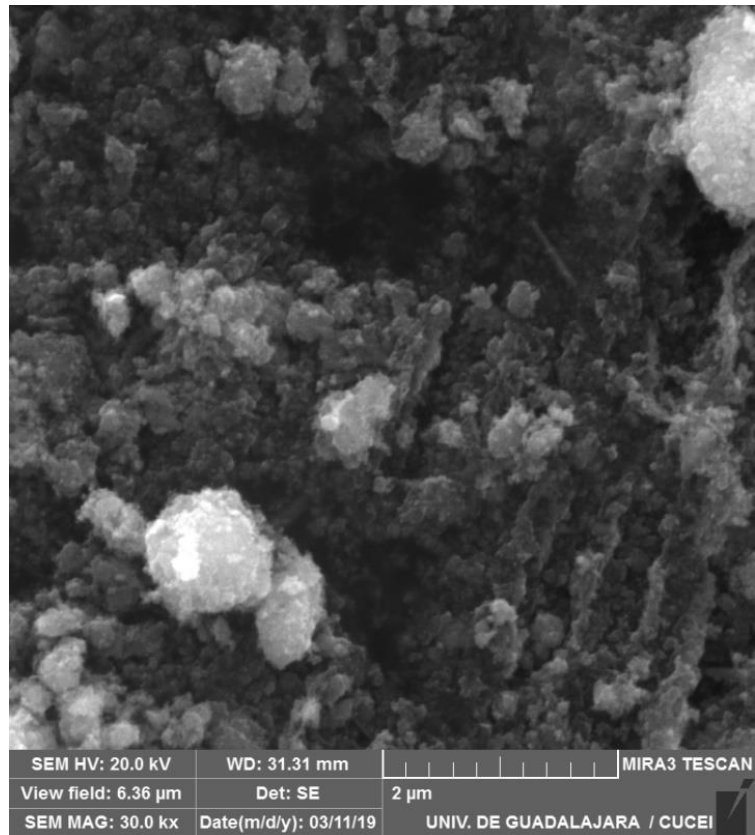
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma maneira de conhecer morfologia dos materiais (LI e ROW, 2018). Partículas com o formato esférico, formando aglomerados heterogêneos e irregulares, com superfície rugosa são observadas nas imagens de microscopia do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , visto nas Figuras 25 e 26. A agregação das partículas de óxido de ferro é devida as interações dipolares magnéticas que esse tipo de material sofre (NI et al., 2010).

Após a polimerização, a imagem de MEV do material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  (Figura 27), como observado anteriormente nas imagens de TEM, foi diferente daquelas obtidas para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Não é mais possível visualizar o formato esférico das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  no material, mas partículas maiores, irregulares em tamanho e forma e mais coesas, característico da rede de sílica formada via processo sol-gel,

Essa propriedade é confirmada pelas análises anteriormente abordadas, que mostram que o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  possui propriedades distintas dos demais materiais sintetizados e que lhe proporcionam características importantes, como: uma maior rede de silício em sua estrutura que leva a maiores valores de área superficial, volume e diâmetro de poro e em consequência, maior degradação da rede ao ser exposta ao aumento de temperatura e diminuição da força de magnetização (OLIVEIRA, de et al., 2019).

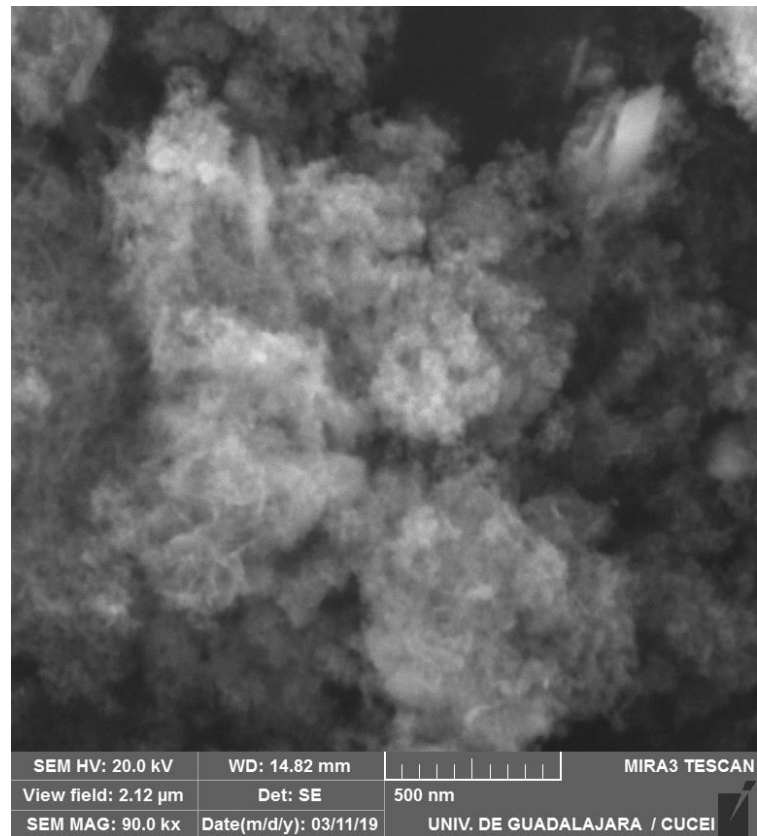
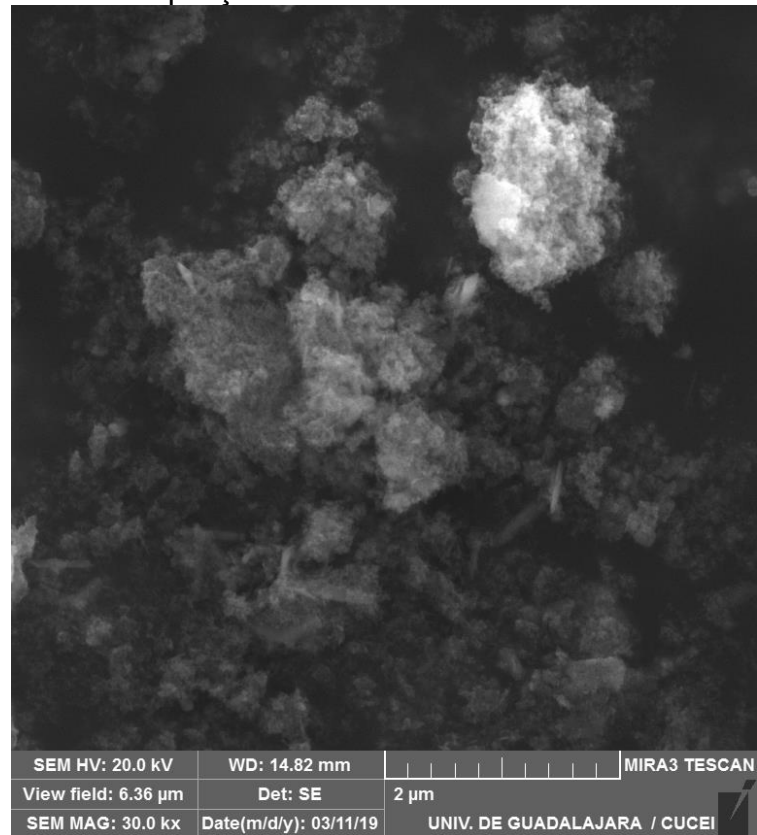
A seguir, são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura dos materiais.

**Figura 25** - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nas ampliações de 30000 e 90000 vezes



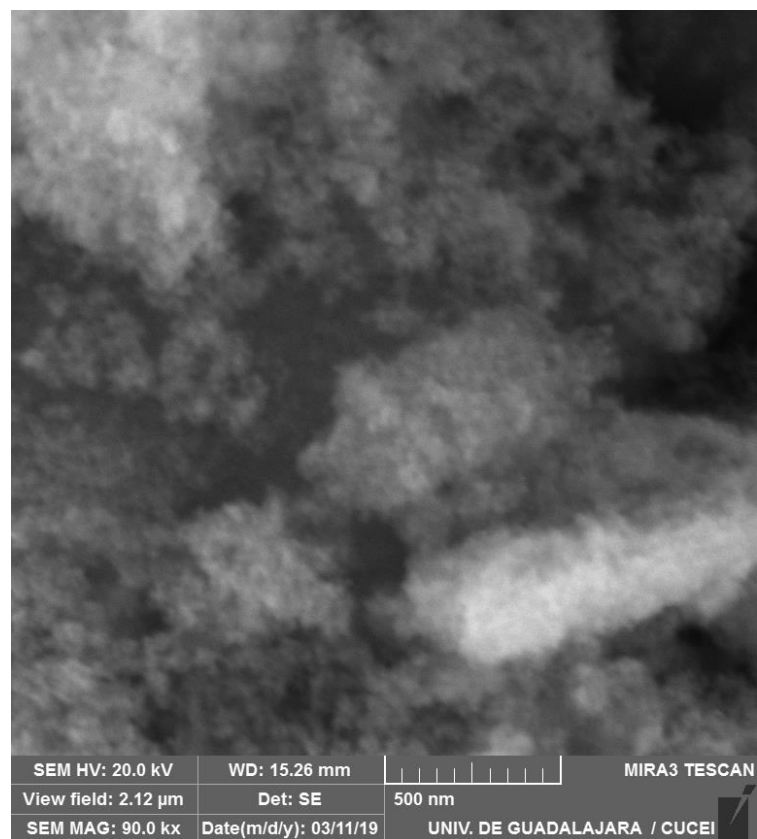
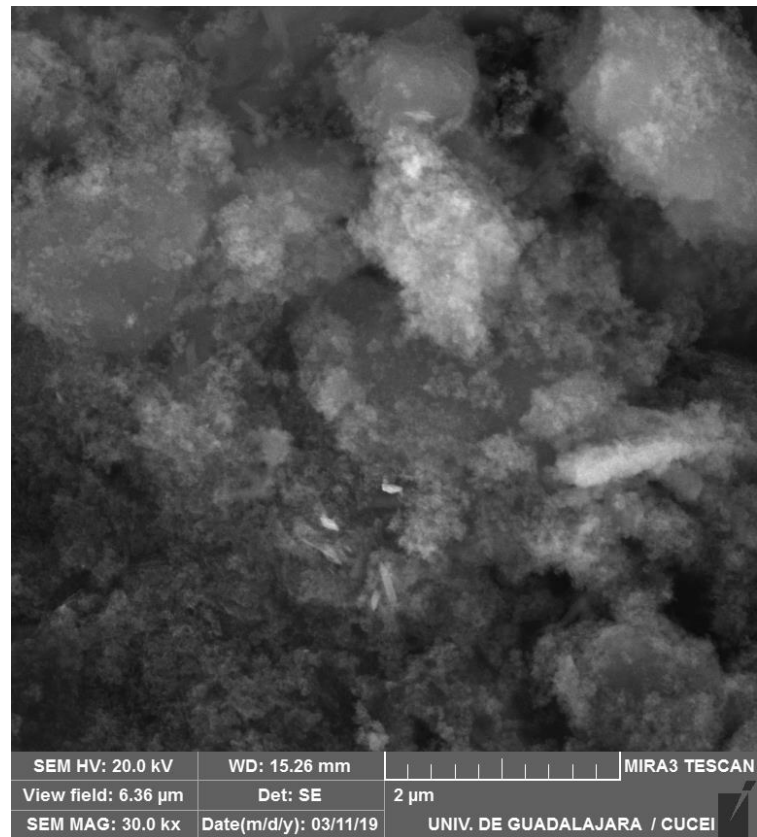
Fonte: o autor

**Figura 26** - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nas ampliações de 30000 e 90000 vezes



Fonte: o autor

**Figura 27** - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  nas ampliações de 30000 e 90000 vezes



Fonte: o autor

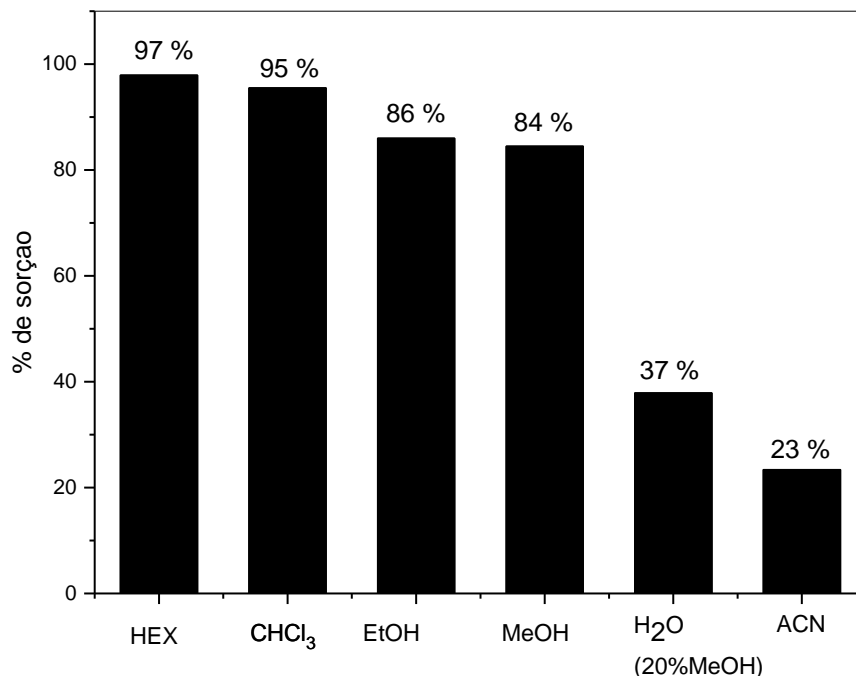
## 5.2 ESTUDOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MAGNÉTICA

Para estabelecer as melhores condições de sorção e eluição do CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , estudos sobre o solvente para o meio de sorção, massa do material, tempo de agitação, solvente de eluição e tempo de eluição foram realizados. Ainda, obteve-se os dados referentes a cinética de sorção e aplicação dos modelos de isotermas e os parâmetros analíticos para o método foram estabelecidos.

### 5.2.1 Estudo do meio extrator para CHO pelo $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ e comparação com o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$

O estudo da influência do meio extrator na sorção do CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foi realizado com os solventes metanol, etanol, hexano, clorofórmio, acetonitrila e água com 20% de metanol, utilizando 10,0 mg do material em 10,0 mL de solução de CHO 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Os percentuais de remoção obtidos são exibidos na Figura 28.

**Figura 28** – Percentuais de sorção de CHO em diferentes solventes para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



Fonte: O autor

A molécula do CHO pode ser classificada como um álcool (Figura 1), porém, por tratar-se de uma molécula com cadeia carbônica relativamente grande e apenas

um grupo OH, o CHO é pouco solúvel em água e, por esse motivo, não foi possível a realização de estudos em meio aquoso.

Utilizando solventes orgânicos, os maiores percentuais de sorção foram alcançados em solventes com polaridade baixa (clorofórmio) ou apolar (hexano), indicando que os sítios de ligação do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  possuem propriedades hidrofílicas. O CHO, quando solubilizado no clorofórmio ou hexano, têm interações do tipo dispersão de London, e a religação do CHO com o material sintetizado acontece por ligações de hidrogênio, entre o grupo hidroxila do CHO e o grupamento  $\text{NH}_2$  do polímero, obtido após a clivagem química da ligação covalente do CHO+ICPTES (Figura 8).

Mesmo fazendo uso de solventes próticos e polares, como é o caso do etanol e do metanol, a porcentagem de sorção não foi baixa, apontando que a interação do CHO com o sorvente ocorre por meio de ligações de hidrogênio, entre o grupo hidroxila do CHO e o grupamento  $\text{NH}_2$  do polímero.

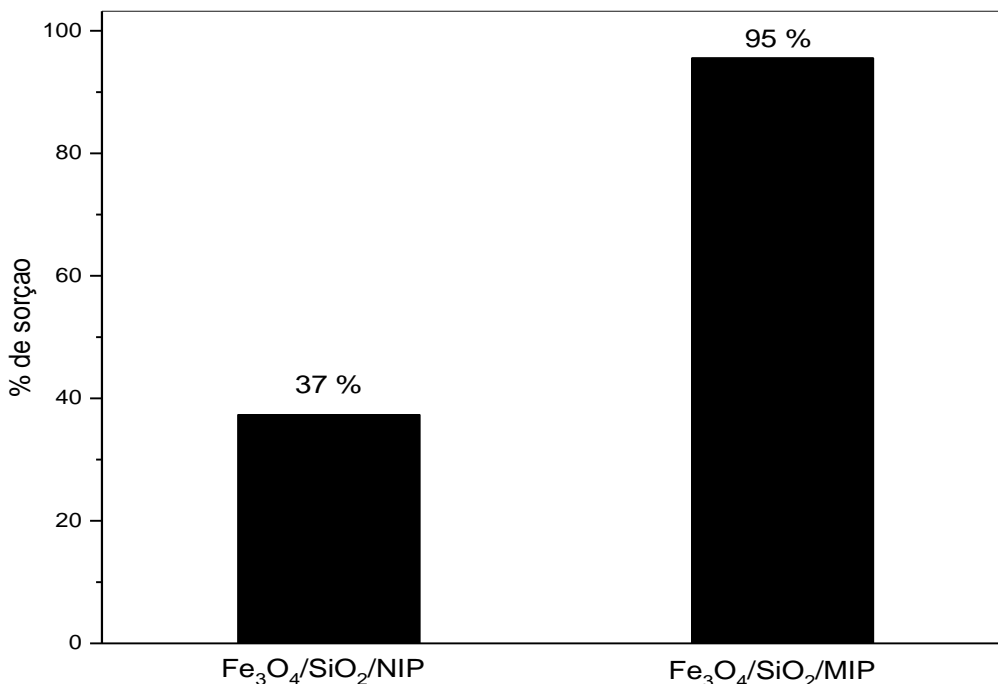
Comparando-se os resultados entre o hexano e o clorofórmio, os dois solventes em que se obteve melhor sorção, optou-se pelo uso do clorofórmio como solvente no processo de extração em fase sólida magnética do CHO, tendo em vista a futura aplicação do método em amostras alimentícias. Diferentemente do hexano, o clorofórmio é fracamente polar e, por conta desta característica, acredita-se que o clorofórmio seja um solvente mais adequado para extrair o CHO da matriz alimentícia.

Avaliou-se também a sorção de CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  (Figura 29), material sem a impressão, utilizando clorofórmio como solvente extrator. Utilizou-se 10,0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  em 10,0 mL de uma solução de 10,0 mg  $\text{L}^{-1}$  de CHO em clorofórmio, apresentando uma adsorção de 37%, valor menor que o obtido com o material impresso (95%).

Nesse material não houve a impressão molecular da molécula molde, os grupos funcionais amino foram incorporados diretamente pelo monômero funcional (3-aminopropil)-trietoxissilano (Figura 10). Esses valores de sorção podem ser relacionados com os resultados apresentados na caracterização dos materiais. O  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , apresentou valores superiores para área superficial, volume de poro e diâmetro de poro, em comparação com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , o que torna os sítios de ligação mais disponíveis. Ainda, para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  tem-se a possibilidade de que os grupos amino provenientes do monômero (3-aminopropil)-trietoxissilano tenham

reagido durante a etapa de polimerização, como discutido nos dados texturais, tornando menor a quantidade de grupos amino disponíveis para o analito.

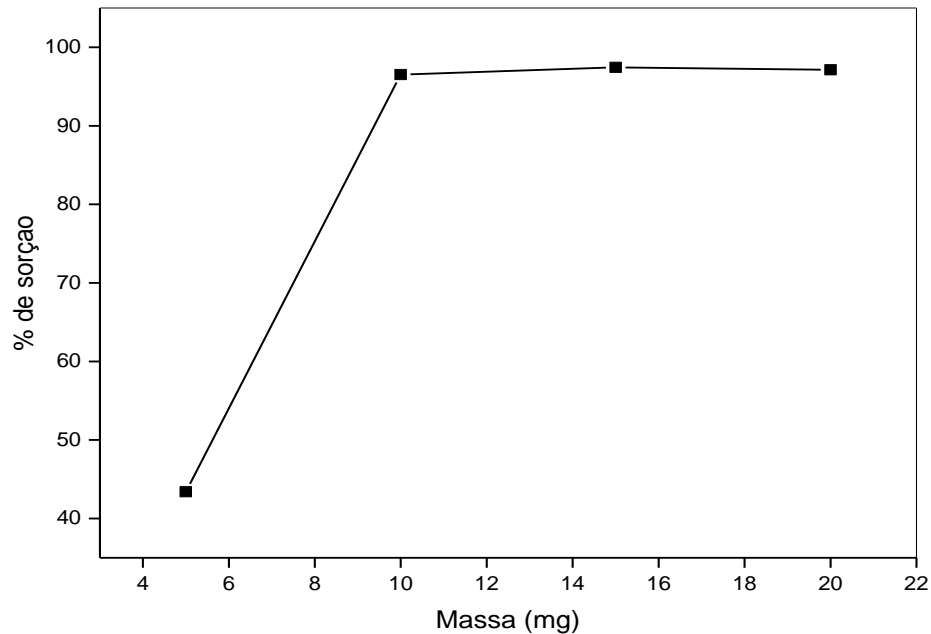
**Figura 29** - Percentuais de adsorção de CHO comparando o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ .



Fonte: o autor

### 5.2.2 Influência da massa de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ na extração de CHO

A fim de avaliar a quantidade necessária de material magnético para os experimentos de sorção, realizou-se estudos variando-se a massa de 5,0 até 20,0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , agitando 10,0 mL de uma solução de CHO 10,0 mg L<sup>-1</sup> em clorofórmio durante 60 segundos. Observa-se (Figura 30) que a partir de 10,0 mg de material adsorvente obtêm-se a capacidade máxima de sorção. Assim, essa massa foi adotada para a sequência dos experimentos.

**Figura 30 - Estudo da massa de adsorvente**

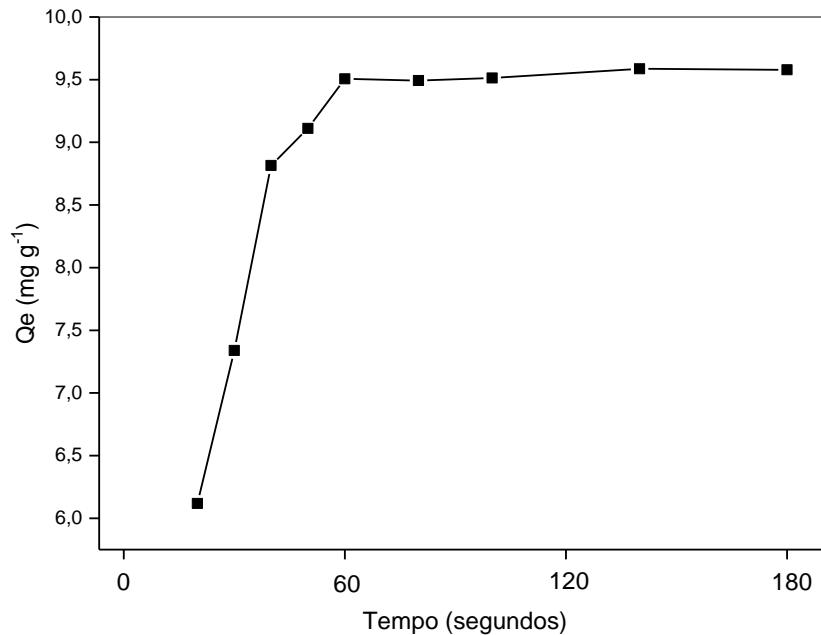
**Fonte:** o autor

### 5.2.3 Otimização do tempo de agitação e estudo cinético

Com o intuito de determinar o tempo de equilíbrio do analito entre fase sólida e líquida, garantindo eficiência de sorção e agilidade no processo de extração, o tempo de agitação necessário para uma máxima sorção de CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foi estudado empregando-se um agitador Vortex, agitando-se 10,0 mg do material em 10,0 mL de uma solução de CHO em clorofórmio, com concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , avaliando-se tempos entre 20 e 180 segundos. Os resultados são expostos na Figura 31, onde observa-se que a partir de 60 segundos o processo de sorção estabiliza e atinge o equilíbrio.

Tempos de equilíbrio relativamente baixos e eficiência de sorção são pontos importantes para o desenvolvimento de um método, resultando em uma boa frequência analítica. A rápida sorção pode ser explicada pela natureza do método sortivo e associada a um grande número de locais ativos nas cavidades de impressão superficiais do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , o que resulta em um processo de transferência de massa (difusão + convecção) das moléculas de CHO da solução para os sítios de ligação mais rápido. Essa era uma característica esperada para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , devido a extração em fase sólida magnética com a agitação realizada em Vortex, mais vigorosa quando comparada a agitação magnética ou mesa agitadora.

**Figura 31** – Influência do tempo de contato entre 10,0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  e 10,0 mL de solução de CHO  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  no processo de sorção



**Fonte:** o autor

Visando compreender o processo sortivo, avaliou-se o ajuste de modelos cinéticos de pseudo-primeira linearizado, pseudo-segunda ordem linearizado, Elovich e Difusão intrapartícula aos dados experimentais. Os parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 4.

O modelo de pseudo-primeira ordem não se ajustou satisfatoriamente aos dados, com valor baixo de coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Esse modelo pressupõe que a taxa de sorção do analito é proporcional ao número de sítios desocupados e, que esses sítios possuem energias iguais (PLAZINSKI, RUDZINSKI e PLAZINSKA, 2009).

Avaliando-se os valores de coeficiente de determinação para os demais modelos, o modelo cinético com melhor ajuste ao processo sortivo do CHO pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foi o pseudo-segunda ordem. Esse modelo assume a existência de sítios com energias de ligação diferentes na superfície do material, onde inicialmente o processo de sorção ocorre em sítios mais disponíveis, para posterior ocupação de sítios interiores (AZIZIAN, 2004). Os sítios de maior interação são atribuídos aos sítios de impressão química contendo o grupo amino, provenientes da clivagem química do produto CHO-ICPTES, capazes de interagir com o CHO por ligações de hidrogênio,

enquanto os sítios de menor energia podem ser referentes a grupos silanóis residuais na matriz polimérica.

**Tabela 4** – Parâmetros cinéticos preditos pelos modelos, para a adsorção de CHO pelo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP

Pseudo 1ª Ordem			Pseudo 2ª Ordem		
$Q_t = Q_e (1 - e^{-k_1 t})$			$Q Q_t = \frac{Q_e^2 k_2 t}{k_2 Q_e (t + 1)}$		
K <sub>1</sub>	Q <sub>e</sub>	R <sup>2</sup>	K <sub>2</sub>	Q <sub>e</sub>	R <sup>2</sup>
0,21	1,53	0,34	9,94	9,81	0,99
Elovich			Difusão Intrapartícula		
$Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t$			$Q_t = k_{id} t^{1/2} + C$		
B	A	R <sup>2</sup>	K <sub>id</sub>	C	R <sup>2</sup>
0,27	1,31	0,97	9,44	0,73	0,94
8,21	3685,64	0,86	0,02	9,56	0,95

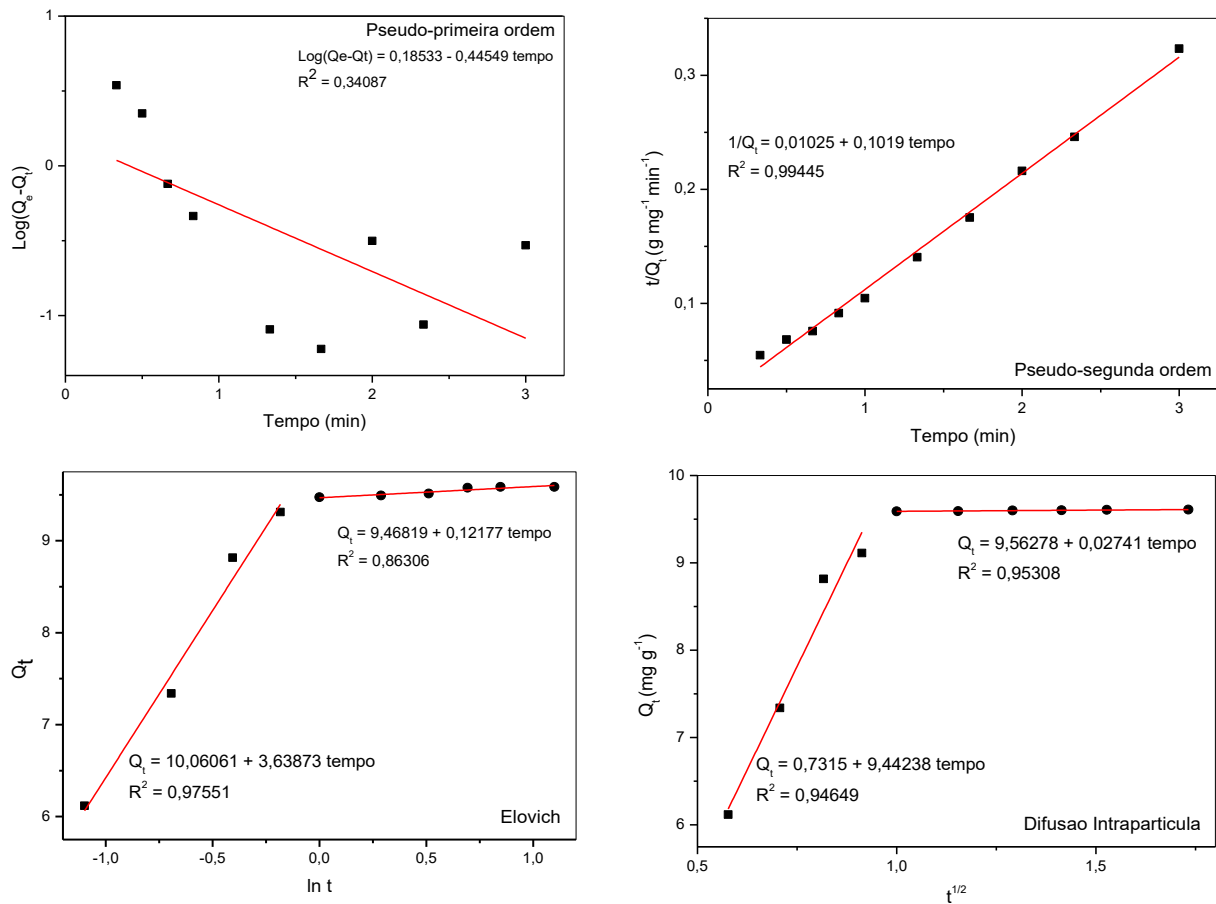
K<sub>1</sub> – Constante de velocidade de pseudo primeira ordem (min<sup>-1</sup>); K<sub>2</sub> – constante de velocidade de pseudo segunda ordem (min<sup>-1</sup>); β - parâmetro relacionado a extensão da camada de cobertura e energia de ativação para quimiossorção (g mg<sup>-1</sup>); α - constante de velocidade de sorção inicial (min<sup>-1</sup> mg g<sup>-1</sup>); K<sub>id</sub> – coeficiente de difusão interno (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-1/2</sup>); C – constante relacionada à espessura da camada limite (mg g<sup>-1</sup>).

O modelo de Elovich apresentou dois segmentos lineares, com ajuste satisfatório, apontando para sítios ativos com energias heterogêneas, corroborando com o modelo de pseudo-segunda ordem. Segundo esse modelo, a primeira etapa do processo relaciona-se com a sorção em sítios externos do material e a segunda etapa, com sítios internos (WILLIAM et al., 2016).

Para o modelo de difusão intrapartícula também se observou dois segmentos lineares, descrevendo que o processo de sorção necessita de duas etapas para ocorrer. A primeira, referente à difusão do analito da solução para a superfície externa do material sorvente em um curto tempo. A segunda etapa é descrita como difusão intrapartícula, na qual ocorre a sorção gradual do analito nos sítios no interior do material, de forma mais lenta e gradual. Nesse modelo, quando o valor da constante de difusão intrapartícula (C - intercepto da primeira reta) é positivo (0,73) e não passa pela origem, aponta que o processo de difusão intrapartícula não é o único que governa o processo de sorção em estudo e que a sorção também ocorre na superfície (WU, TSENG e JUANG, 2009).

Os dados ajustados aos modelos cinéticos pseudo-primeira, pseudo-segunda ordem, Elovich e Difusão Intrapartícula estão dispostos na Figura 32.

**Figura 32** - Modelos de Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem, Elovich e Difusão Intraparticula aplicados aos dados cinéticos para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$

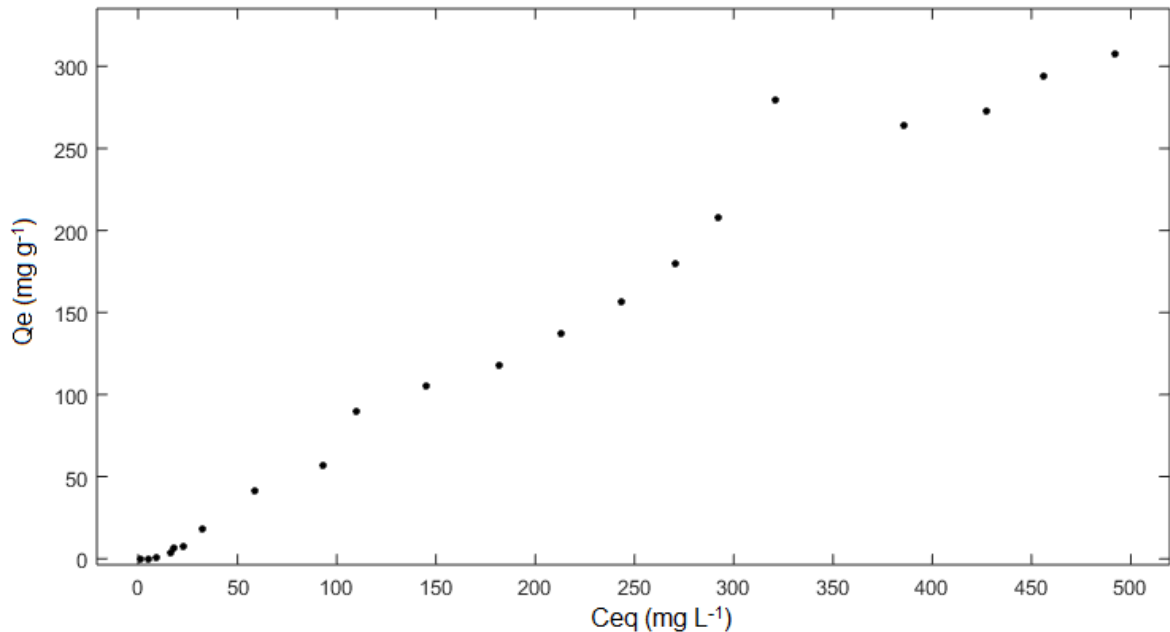


Fonte: o autor

#### 5.2.4 Construção das isotermas de sorção

O estudo das isotermas de sorção mostra a quantidade de um determinado soluto adsorvida por uma superfície adsorvente ( $Q_e$ ), em função da concentração de equilíbrio do soluto ( $C_e$ ). A capacidade máxima de sorção obtida foi  $314,05 \text{ mg g}^{-1}$ , que comparado a maioria dos trabalhos reportados, encontra-se entre os maiores valores.

A concentração de CHO utilizada variou de  $1,0$  a  $800,0 \text{ mg L}^{-1}$  e os dados são apresentados na Figura 33.

**Figura 33 - Isoterma de sorção do CHO**

Fonte: o autor

Aplicou-se aos dados obtidos experimentalmente, os modelos linearizados de Langmuir e Freundlich, Langmuir-Freundlich para um sítio e Langmuir-Freundlich para dois sítios. Os parâmetros calculados estão dispostos na Tabela 5.

O modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios de sorção apresentou melhor ajuste aos dados experimentais, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99 e um erro de ajuste ao modelo (RMSE, do inglês, *root mean square error*) de 9,30, menor entre todos os modelos testados, corroborando com os dados cinéticos obtidos (ajuste satisfatório aos modelos que apontam para diferentes energias de ligação).

A capacidade máxima de sorção predita por esse modelo é a soma dos parâmetros  $b_1$  e  $b_2$ , igual a 354,27 mg g<sup>-1</sup>, valor próximo ao encontrado experimentalmente.

Esse modelo consiste na combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, sugerindo diferentes sítios de interação no sorvente, com energia de ligação diferente em relação a ligação com o analito. Inicialmente, em baixas concentrações, a sorção de CHO acontece nos sítios de ligação de NH<sub>2</sub> do MIP, com alta afinidade e que estão na superfície do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP e é governado pelo modelo de Freundlich. Em altas concentrações, o modelo de Langmuir assume o processo de sorção, que acontece em sítios de ligação de baixa afinidade, no interior do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP, presumivelmente pelos grupos silanóis residuais na matriz polimérica.

**Tabela 5 –** Parâmetros preditos pelos modelos de isoterma para sorção de CHO em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP.

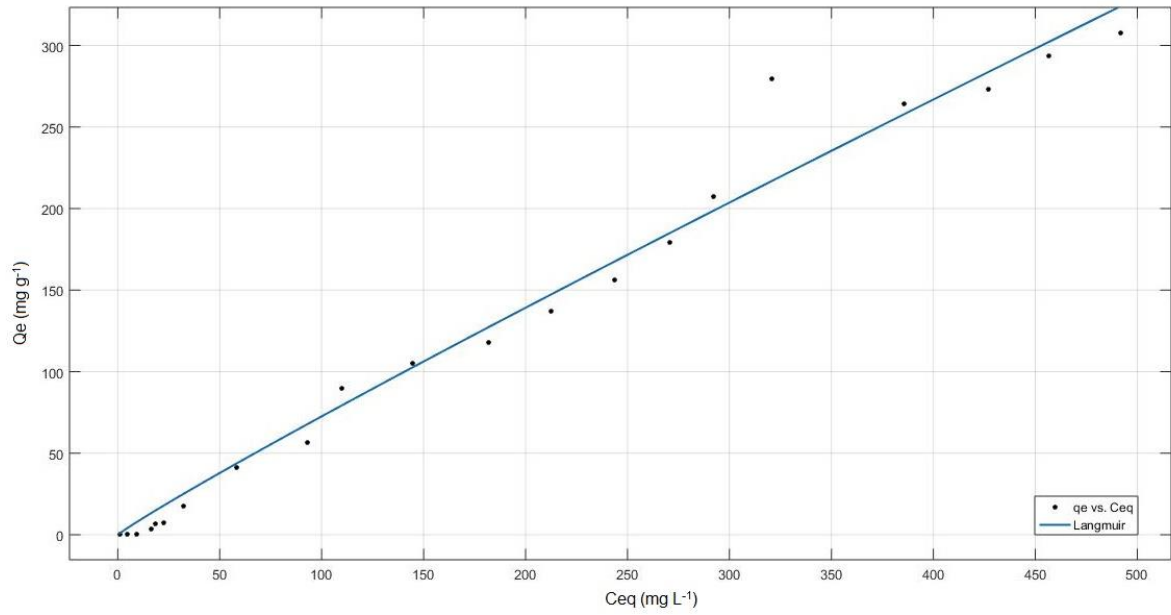
Modelo	Equação	Parâmetro	
Langmuir	$Q_{eq} = \frac{K_b C_{eq}}{1 + (K_b C_{eq})}$	K <sub>L</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,57
		b (mg g <sup>-1</sup> )	0,68
		R <sup>2</sup>	0,97
		RSME	17,45
Freundlich	$Q_{eq} = (K C_{eq})^{1/n}$	K <sub>F</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	0,96
		N	0,93
		R <sup>2</sup>	0,97
		RSME	16,99
Langmuir-Freundlich para um sítio	$Q_{eq} = \frac{b(K C_{eq})n}{1 + (K C_{eq})n}$	k <sub>1</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,003
		b <sub>1</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	400,70
		n <sub>1</sub>	1,79
		R <sup>2</sup>	0,97
		RSME	17,18
Langmuir-Freundlich para dois sítios	$Q_{eq} = \frac{b_1 (K_1 C_e)^{n_1}}{1 + (K_1 C_e)^{n_1}} + \frac{b_2 (K_2 C_e)^{n_2}}{1 + (K_2 C_e)^{n_2}}$	k <sub>1</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,004
		b <sub>1</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	275,50
		n <sub>1</sub>	1,50
		k <sub>2</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,003
		b <sub>2</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	78,77
		n <sub>2</sub>	85,78
		R <sup>2</sup>	0,99
		RSME	9,30

K<sub>L</sub>(Langmuir), K<sub>F</sub>(Freundlich): parâmetro relacionado a afinidade do adsorvato-adsorvente; b<sub>1,2</sub> – constante relacionada à capacidade máxima de sorção; n<sub>1,2</sub> – constante relacionada a intensidade de sorção ou grau de heterogeneidade.

**Fonte:** o autor

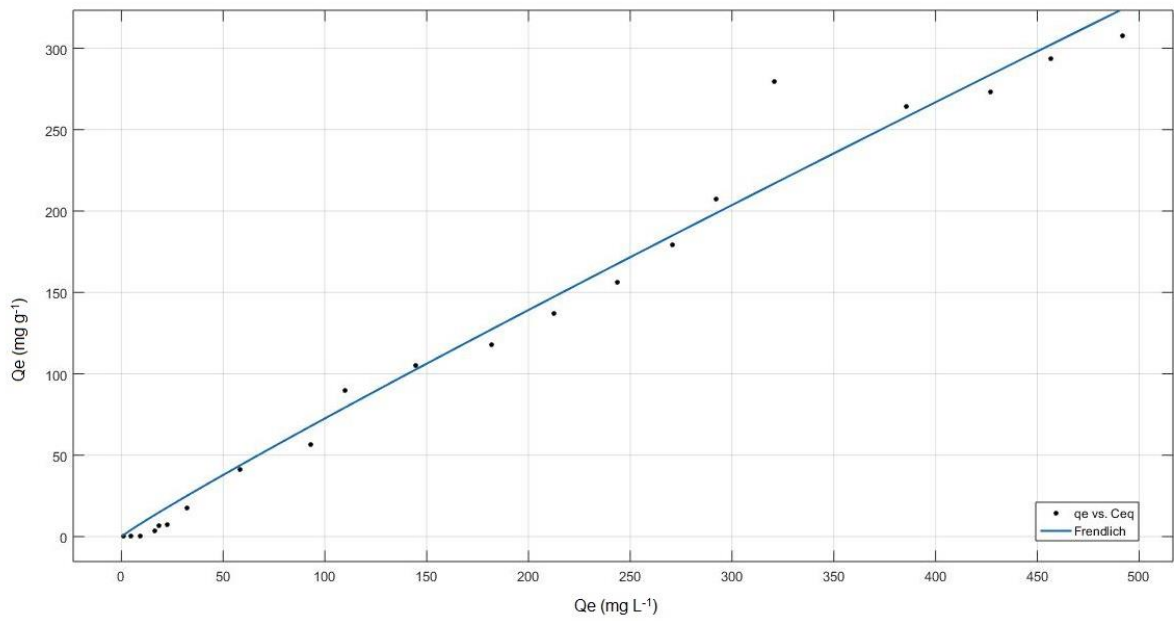
As isotermas de sorção do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP para o CHO são apresentadas nas Figuras 34 a 37.

**Figura 34 - Isoterma de sorção com aplicação do modelo linearizado de Langmuir**



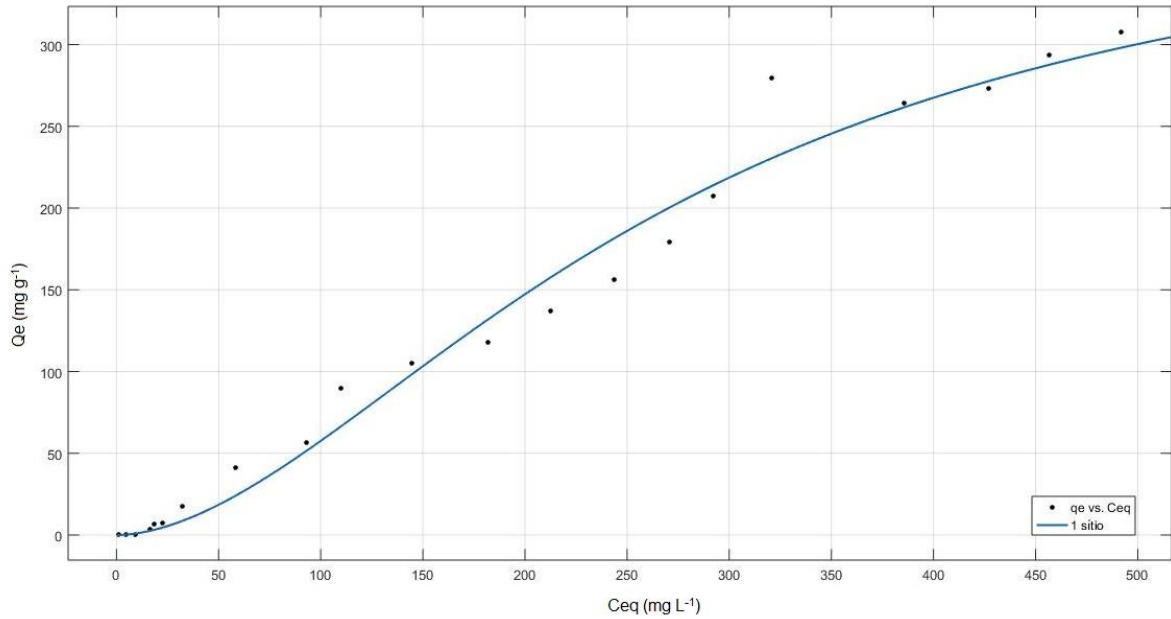
Fonte: o autor

**Figura 35 - Isoterma de sorção com aplicação do modelo linearizado de Freundlich**



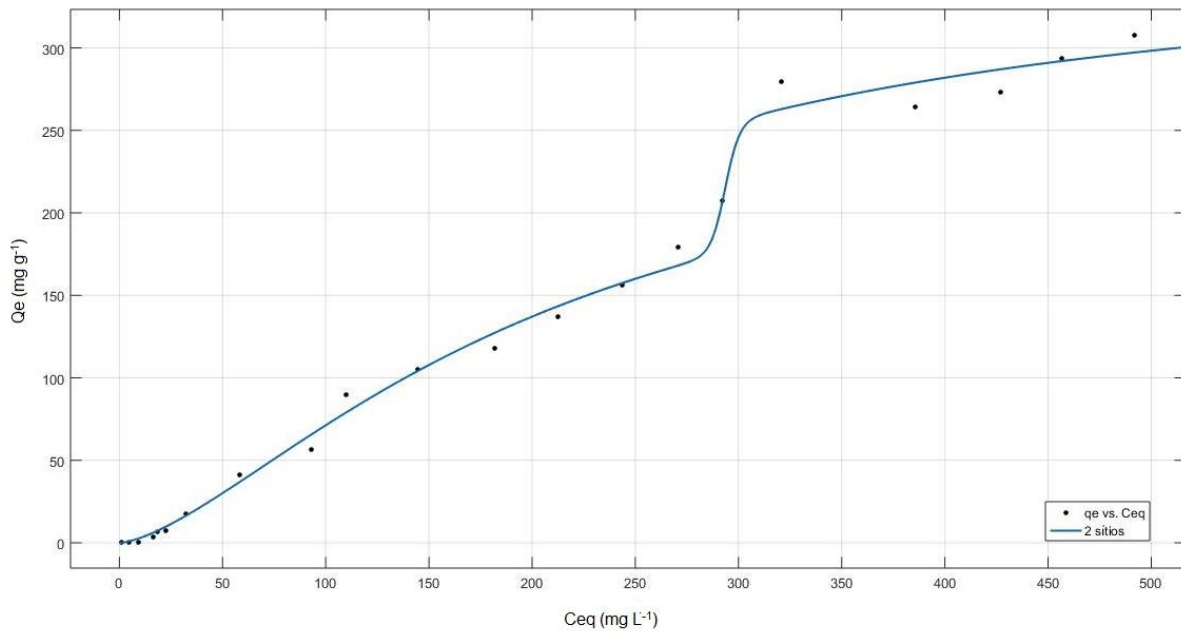
Fonte: o autor

**Figura 36** - Isoterma de sorção com aplicação do modelo de Langmuir-Freundlich para um sítio de sorção



Fonte: o autor

**Figura 37** - Isoterma de sorção com aplicação do modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios de sorção



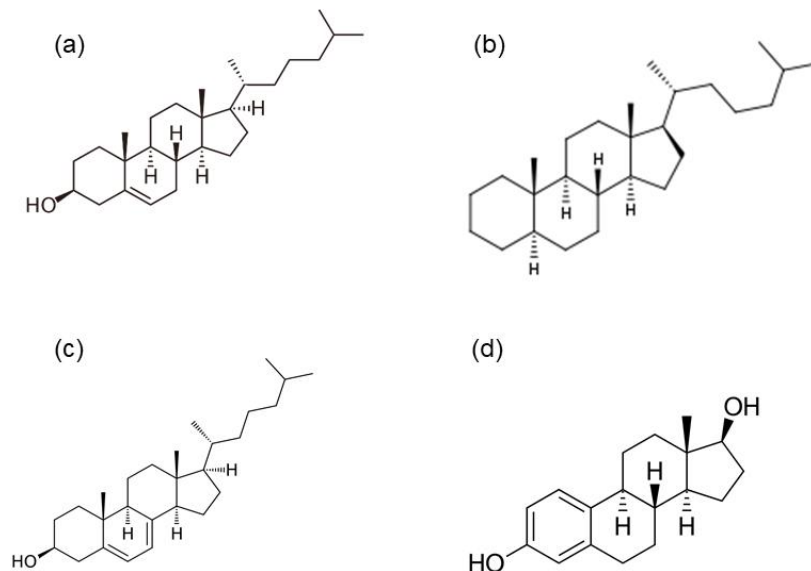
Fonte: o autor

### 5.2.5 Avaliação da seletividade do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP para CHO

Para avaliar o efeito de impressão do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP em relação ao analito alvo realizou-se estudos de sorção de soluções binárias contendo o CHO e possíveis interferentes estruturalmente similares, na proporção 1:1 (m/m) nos materiais Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/MIP ou Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NIP. Os experimentos foram realizados empregando 10,0 mg do material, agitados com a solução contendo o CHO e o interferente nas condições otimizadas de meio extrator e tempo de agitação. A partir destes experimentos, foram determinados os parâmetros relacionados ao desempenho da seletividade do sorvente: coeficiente de distribuição (K<sub>d</sub>), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k'), calculados a partir das Equações 14, 15 e 16 descritas no Item 4.4.6 (MARESTONI et al., 2013).

A escolha dos interferentes foi realizada levando em consideração a estrutura química e os grupos funcionais em comparação com o CHO. Na Figura 38 é apresentado a fórmula estrutural do CHO (a) e dos interferentes escolhidos, 5- $\alpha$ -colestano (b), 7-dehidrocolesterol (c) e estradiol (d).

**Figura 38** - Fórmula estrutural do CHO (a) e dos interferentes escolhidos, 5- $\alpha$ -colestano (b), 7-dehidrocolesterol (c) e estradiol (d)



Fonte: adaptado de CLAUSEN, PIRES e TARLEY, 2014

Os valores obtidos para o coeficiente de distribuição, coeficiente de seletividade e coeficiente de seletividade relativo (k') são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Ao comparar o coeficiente de seletividade do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , razões acima de 1 confirmam o efeito de impressão química no material com  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ . Os resultados indicam que as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  têm maior capacidade de sorção para o CHO em relação aos interferentes, demonstrando que o material tem uma capacidade seletiva (CLAUSEN, PIRES e TARLEY, 2014).

**Tabela 6** – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e 5- $\alpha$ -colestano

Adsorvente	Concentração inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Kd ( $\text{mL g}^{-1}$ )		K	K'
	CHO	5- $\alpha$ -colestano	CHO	5- $\alpha$ -colestano		
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	10	10	1734,82	100,10	17,33	11,81
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$			408,72	278,74	1,46	

Fonte: o autor

**Tabela 7** – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e 7-dehidrocolesterol

Adsorvente	Concentração inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Kd ( $\text{mL g}^{-1}$ )		K	K'
	CHO	7-dehidro Colesterol	CHO	7-dehidro colesterol		
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	10	10	1568,33	826,17	1,81	1,75
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$			495,26	476,34	1,03	

Fonte: o autor

**Tabela 8** – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para o CHO e estradiol

Adsorvente	Concentração inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Kd ( $\text{mL g}^{-1}$ )		K	K'
	CHO	Estradiol	CHO	Estradiol		
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	10	10	1758,30	355,73	4,94	2,33
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$			644,42	304,96	2,11	

Fonte: o autor

Ainda, comparando o material impresso com o não impresso, a menor sorção de CHO e dos interferentes pode ser explicada pela pouca disponibilidade das cavidades seletivas na estrutura do material  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , justificado pela possível

reação dos grupos amino responsáveis pela ligação com o CHO, como discutido nos dados texturais. Uma comparação dos valores de  $K_d$  para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$  mostra um aumento do  $K_d$  para o CHO, enquanto  $K_d$  diminui para os interferentes.

Além disso, a capacidade de sorção do CHO na presença 7-dehidrocolesterol é um pouco menor. Analisando as estruturas dos compostos, percebe-se que as exigências de espaço do CHO versus 7-dehidrocolesterol são iguais, com a presença da cadeia carbônica lateral e do grupo funcional -OH em ambas as moléculas, justificando a competição pelos sítios sortivos com o CHO, uma vez que o grupamento -OH é responsável pela ligação aos sítios de ligação  $\text{NH}_2$  do material sorvente, justificando a competição pelos sítios sortivos com o CHO. A molécula 5- $\alpha$ -colestano, possui estrutura semelhante, mas com a ausência do grupo funcional -OH, responsável pela ligação aos grupos amino e, conseqüentemente, sua adsorção foi menor. O estradiol, em contraste, possui dois grupos OH, porém não possui uma cadeia carbônica lateral, encaixando na mesma cavidade do CHO e, ainda assim, sua capacidade de adsorção é menor, devido à ausência da cadeia lateral (YAVUZ et al., 2007; CLAUSEN, 2014).

Considerando a diferença estrutural entre o CHO e os interferentes analisados, infere-se que a religação da molécula modelo ao material adsorvente durante o processo de sorção ocorre por ligação de hidrogênio entre o grupamento -OH no CHO e o grupo - $\text{NH}_2$  no material impresso, sendo o grupo hidroxila crucial para a religação do modelo. Resultado esse esperado, devido ao método de síntese semi-covalente que foi empregado, em que a molécula molde religa-se por ligações de hidrogênio ao sorvente (WHITCOMBE et al., 1995; TANG et al., 2017).

#### 5.2.6 Influência do solvente de eluição

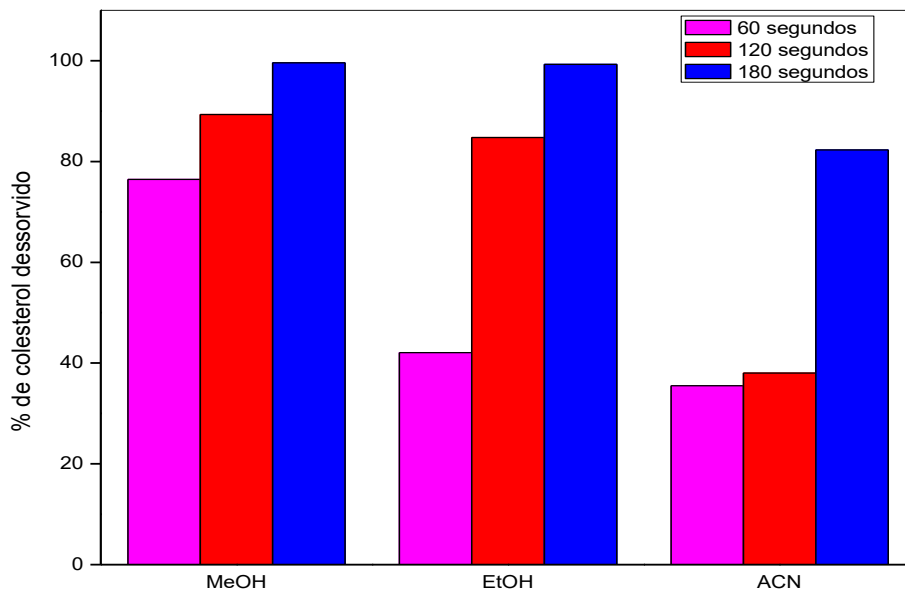
A eluição do analito foi examinada após a separação do meio extrator clorofórmio do sorvente utilizado na extração em fase sólida magnética, com os solventes metanol, etanol e acetonitrila, avaliando-se tempos de 60, 120 e 180 segundos.

A escolha desses solventes levou em consideração os estudos de extração em que a molécula de CHO apresentou menor sorção no  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  em solventes polares. Presume-se que solventes polares e próticos enfraqueçam as interações de

hidrogênio entre o grupo hidroxila do CHO e o grupo  $\text{NH}_2$  do sorvente, reduzindo a afinidade e facilitando o processo de eluição (LEE, HUNG e HWANG, 2009).

Novamente realizou-se a avaliação empregando-se tempos de agitação curtos, com agitação vigorosa em vortex, a fim de obter-se um método rápido na extração e eluição do CHO. Os dados obtidos são apresentados na Figura 39.

**Figura 39** - Porcentagem de eluição de CHO para os solventes metanol, etanol e acetonitrila para 60, 120 e 180 segundos



Fonte: o autor

As melhores dessorções do analito foram obtidas com o uso do metanol e etanol, 99% para ambos, no tempo de 180 segundos. Os dois solventes possuem polaridade semelhante e a acetonitrila, menos polar em comparação ao MeOH e ao EtOH, não apresentou bons índices de eluição em nenhum dos tempos estudados.

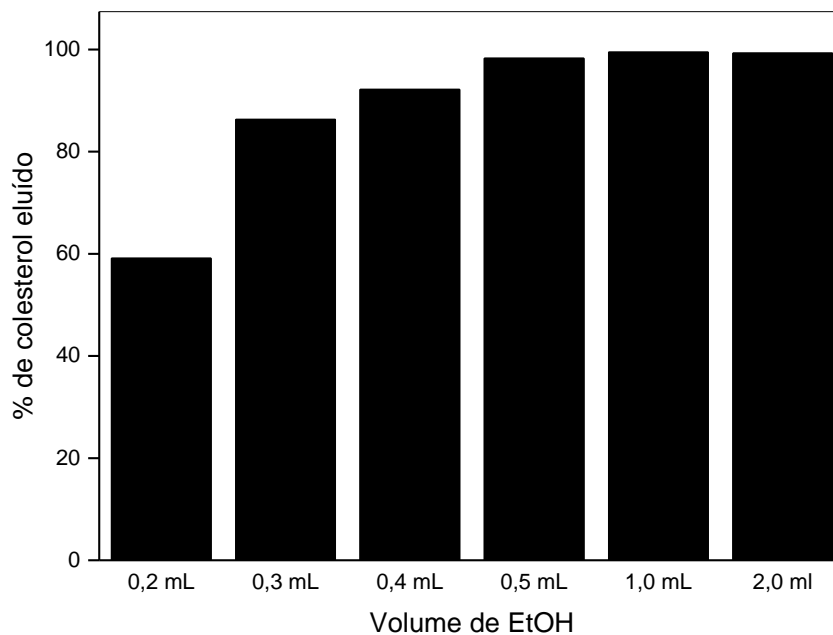
Vale mencionar que nos estudos de extração em fase sólida magnética, a sorção do CHO foi de 86% em etanol e 84% em metanol, esperando-se que esses solventes não fossem apropriados para eluir quantitativamente o CHO. Todavia, após o processo de sorção e separação de fases, uma pequena quantidade de clorofórmio permanecia no tubo de extração, que após a adição de etanol e metanol em quantidades superiores, competem pelos sítios sortivos, ocorrendo a eluição.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que a interação CHO com sítios de ligação do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  ocorre por meio da formação de ligação de hidrogênio entre os grupos amino do monômero funcional e o grupo hidroxila da

molécula de CHO. Esses grupos amino são provenientes da clivagem química necessária para a remoção da molécula molde na síntese semi-covalente (MATOS CORDEIRO BORGES, LEIJOTO e BASTOS BORGES, 2017; SHI et al., 2014).

Com os resultados obtidos mostrando porcentagens de eluição parecidas para o metanol e etanol, optou-se pelo uso do etanol como solvente de eluição, devido a maior toxicidade do metanol e, avaliou-se a possibilidade de diminuir a quantidade de etanol usada para essa etapa da extração em fase sólida magnética do analito. Para isso, volumes entre 0,2 e 2,0 mL foram estudados e observou-se que quantidades inferiores a 0,4 mL de etanol não foram eficientes para a eluição completa do CHO, sendo 0,5 mL escolhido para a continuação dos experimentos (Figura 40).

**Figura 40** - Porcentagem de eluição de CHO com diferentes volumes de EtOH



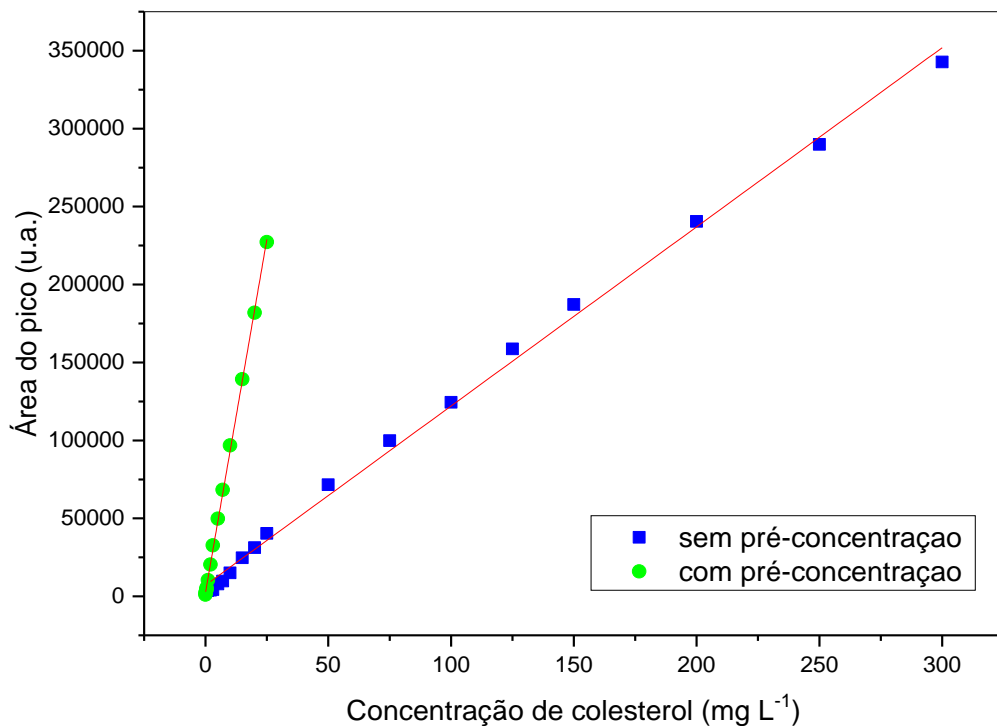
**Fonte:** o autor

### 5.2.7 Determinação dos parâmetros analíticos

A eficiência do método de pré-concentração e eluição foi avaliada com o cálculo das figuras de mérito do sistema: fator de pré-concentração, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e repetibilidade intra-dia e inter-dia (LONG e WINEFORDNER, 1983). Os valores foram obtidos a partir de duas curvas analíticas,

uma com a etapa de pré-concentração no  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  (com as condições de extração e eluição otimizadas), na faixa de 0,05 a 25,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Outra sem essa etapa (as soluções de padrões de CHO eram injetadas diretamente no cromatógrafo), na faixa de 2,0 a 300,0  $\text{mg L}^{-1}$ . As curvas analíticas são apresentadas na Figura 41.

**Figura 41-** Curva analítica para a etapa sem pré-concentração e com a etapa de pré-concentração



Fonte: o autor

A curva analítica com a etapa de pré-concentração é representada pela equação  $y = 9061,86x - 2061,86$  ( $R^2 = 0,998$ ). Para a curva analítica sem a etapa de pré-concentração, obteve-se a equação  $y = 1149,14x - 7168,30$  ( $R^2 = 0,997$ ). O fator de pré-concentração do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  foi 7,88 vezes quando comparado a injeção direta das soluções.

O limite de detecção e quantificação foram calculados de acordo com a IUPAC (Equações 16 e 17, respectivamente, descritas no Item 4.4.7). Obteve-se um LD de  $11,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e LQ de  $38,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A precisão do método foi avaliada em termos de precisão intradia por meio das análises ( $n=10$ ) das concentrações de CHO de 5,0 e 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ , obtendo desvios padrões relativos (DPR) de 1,60% e 1,52% respectivamente. Ainda, a precisão

interdia (dois dias consecutivos) com n=10 também foi avaliada para as mesmas concentrações usadas nas análises intradia, com um DPR de 2,46% e 2,37%, nessa ordem.

As figuras de mérito obtidas no presente método foram comparadas com outros métodos relatados na literatura, com extração em fase sólida empregando MIP, para a determinação de CHO por HPLC-DAD (Tabela 8). Pode-se inferir que o método de pré-concentração proposto, fazendo uso do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  como adsorvente, apresenta valores de LD e LQ satisfatórios, estando abaixo da faixa reportada na literatura e ainda, um bom fator de pré-concentração, características que podem ser úteis na aplicação em amostras que tenham concentrações baixas ou então, em diluições de amostras com quantidades grandes de CHO.

**Tabela 9** - Comparação do método proposto com outros métodos de pré-concentração de CHO com determinação por HPLC-DAD

Adsorvente	Solvente de extração	LD	LQ	FP	Referência
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$	$\text{CHCl}_3$	11,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	38,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	7,88	Este trabalho
MIP ácido metacrílico	HEX	-	1,93 $\text{mg L}^{-1}$	-	Borges, Oliveira e Borges, 2017
MIP N-Methacryloylamido-(l)-phenilalanina methyl éster	MeOH	-	-	-	Inanan et al., 2016
Polímero híbrido Ácido metacrílico/TEOS (6:1) MIP	$\text{CHCl}_3$	1,21 $\text{mg L}^{-1}$	3,75 $\text{mg L}^{-1}$	-	Clausen, et al, 2014
poli(hidroxietilmetacrilato)/poli(glicidilmetacrilato-N-metacrilóil- (L) - tirosina metiléster)	Solução intestinal	50,9 $\text{mg L}^{-1}$	169,0 $\text{mg L}^{-1}$	-	Çağtütü et al., 2014
MIP ácido metacrílico	ACN: $\text{H}_2\text{O}$ (7:3)	0,22 $\text{mg L}^{-1}$	0,71 $\text{mg L}^{-1}$	-	Puoci et al., 2008

As diferenças observadas entre o presente método e os demais podem ser referentes aos diferentes tipos de materiais sorventes e meios de extração. Nenhum trabalho reportado na Tabela 9 apresenta o fator de pré-concentração, que pode ser explicado pelo fato destes não desenvolverem um método analítico de pré-concentração, apenas estudarem a sorção do CHO por um material sorvente ou intencionando uma etapa de limpeza.

#### 5.2.8 Aplicação do método proposto em amostras reais

A aplicabilidade do método proposto em amostras de leite bovino foi averiguada. Diferentes marcas, sendo: A e B - leite UHT integral e, C - leite UHT semidesnatado, foram submetidas ao método desenvolvido e os resultados são apresentados na Tabela 10. As amostras passaram pelo processo de saponificação, a fim de liberar todo o CHO da matriz alimentícia.

Para as amostras B e C realizou-se um teste de adição e recuperação, com a intenção de verificar a exatidão do método.

**Tabela 10** - Concentração de CHO encontrada em três diferentes marcas de leite UHT bovino

Leite bovino	Concentração de CHO obtida (mg Kg <sup>-1</sup> )	Concentração de CHO adicionada (mg Kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
A (integral)	390,07 ± 0,14	0	-
B (integral)	397,61 ± 0,77	0	-
	419,56 ± 1,28	30,0	97,38
C	99,16 ± 0,12	0	-
(semidesnatado)	127,69 ± 1,14	30,0	92,32
	153,94 ± 1,06	60,0	91,64
	200,18 ± 1,34	106,0	92,57

Fonte: o autor

Na literatura, o valor de CHO encontrado em análises de leite bovino pode variar muito. Gorban e Izzeldin (1999), Bauer et al. (2014), Faye et al. (2015) relatam valores que chegam a 490 mg Kg<sup>-1</sup>, quando o animal está produzindo o leite colostro, responsável pela alimentação do bezerro recém-nascido. Segundo Bauer et al., 2014;

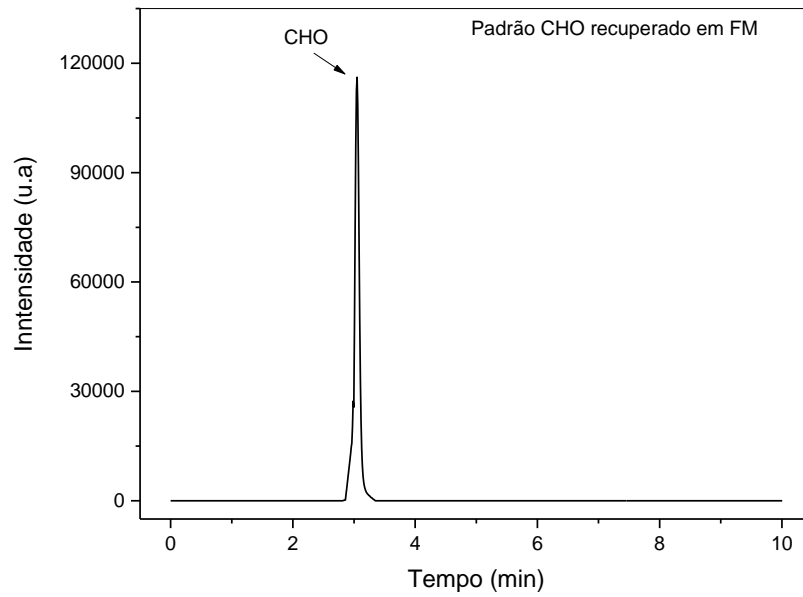
Gorban e Izzeldin, 1999, a quantidade de colesterol no leite bovino é dependente de vários fatores, como: raça e alimentação do animal, época do ano e período de lactação. Esses aspectos influenciam na quantidade de gordura do leite produzido e, conseqüentemente na quantidade de CHO.

Também o processamento que o leite é submetido na indústria interfere nesse valor. A informação sobre a quantidade de gorduras totais é obrigatória e regulamentada pela Portaria 146 do Ministério da Agricultura, de 07/03/1996, sendo que o leite integral deve apresentar mais de 3% de gorduras totais, leite semidesnatado entre 0,6 e 2,9% de gorduras totais e leite desnatado menos de 0,5% de gorduras totais. Como é observado na Tabela 10, o leite integral apresenta mais CHO que o leite semidesnatado. Apesar de toda problemática de saúde que o consumo elevado de alimentos ricos em CHO envolve, na legislação sobre as informações nutricionais (ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001) que devem estar presente nas embalagens, não à obrigatoriedade em rotular na tabela nutricional a quantidade de colesterol, apenas a um incentivo por parte da ANVISA para que esse valor seja informado aos consumidores, a fim de facilitar na busca por uma alimentação saudável.

Os cromatogramas obtidos para a injeção no sistema cromatográfico de um padrão de CHO em  $\text{CHCl}_3$  recuperado em fase móvel e injeção do extrato saponificado da amostra A recuperado em fase móvel e são apresentados nas Figuras 42 e 43.

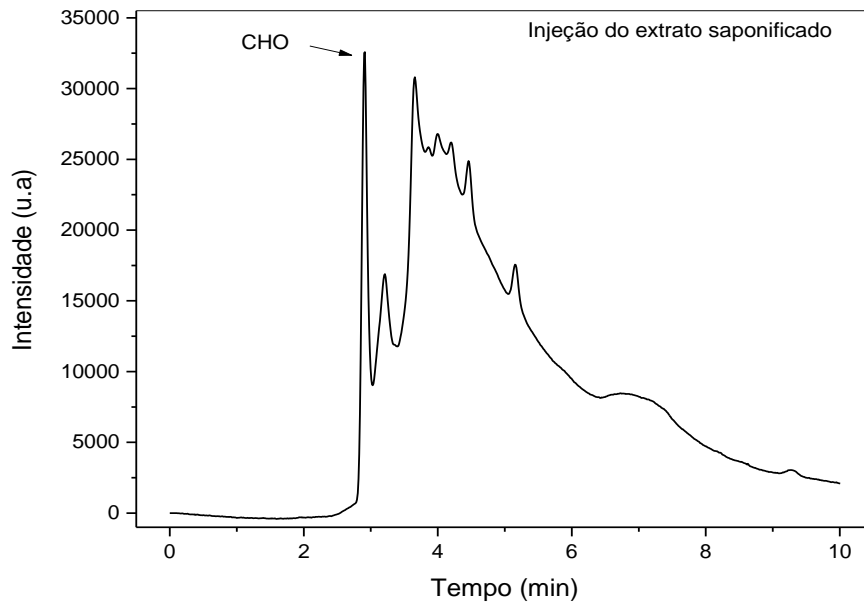
Como é possível observar a partir do cromatograma da Figura 44, fica evidente a necessidade de uma etapa de preparo de amostra, para realizar o isolamento do analito de interesse, CHO. Dessa forma, o extrato saponificado foi submetido ao procedimento de extração e eluição, fazendo uso do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  como fase sólida na pré-concentração e isolamento do CHO por meio da extração em fase sólida magnética.

**Figura 42** - Cromatograma obtido na injeção de um padrão de CHO em  $\text{CHCl}_3$  recuperado em fase móvel



Fonte: o autor

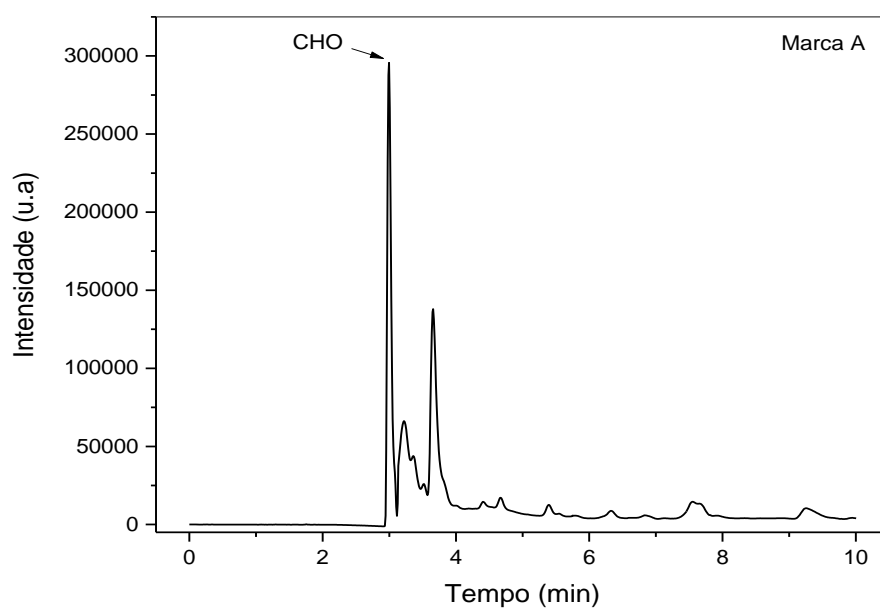
**Figura 43** - Cromatograma obtido na injeção do extrato saponificado da amostra A recuperado em fase móvel



Fonte: o autor

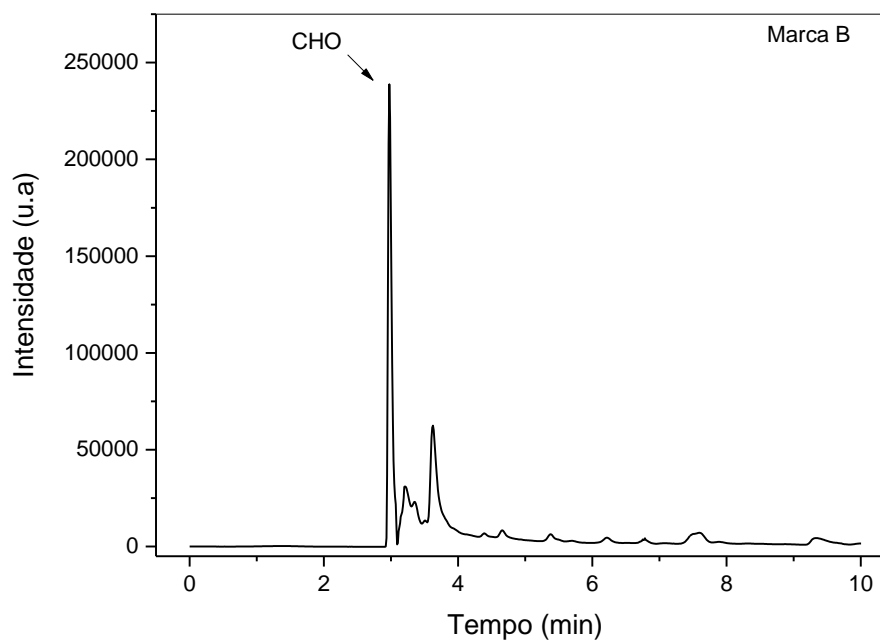
Os cromatogramas das três amostras (Marca A, Marca B e Marca C) após a saponificação, sorção e eluição pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  são apresentados nas Figuras 44 a 46.

**Figura 44** - Cromatograma do extrato saponificado da marca A submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



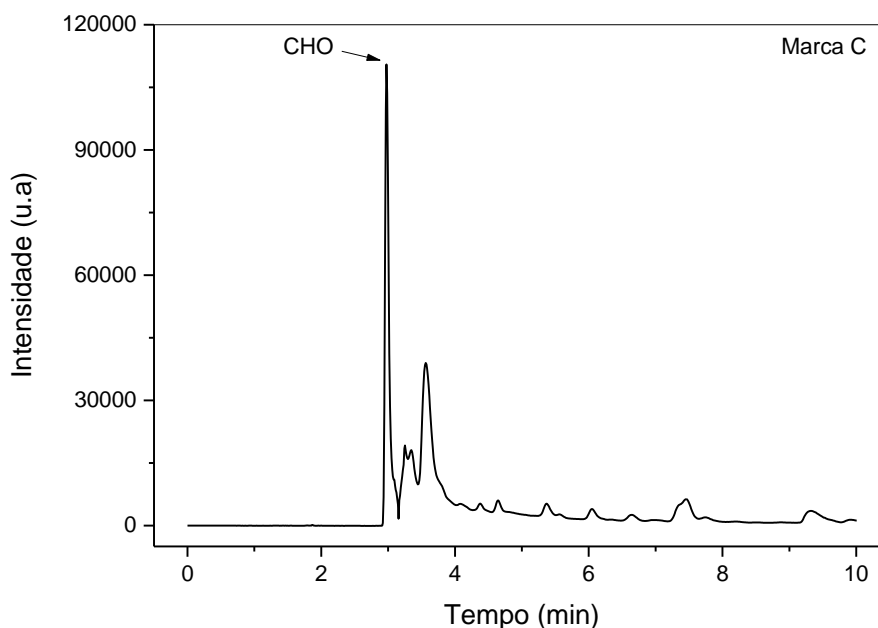
Fonte: o autor

**Figura 45** - Cromatograma do extrato saponificado da marca B submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



Fonte: o autor

**Figura 46-** Cromatograma do extrato saponificado da marca C submetido ao procedimento de sorção e eluição pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$



**Fonte:** o autor

Diferentemente do cromatograma obtido na injeção do extrato saponificado, os cromatogramas das amostras que passaram pelo protocolo do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , mostram o pico de CHO com uma boa separação. Esse fato deixa evidente que CHO precisa ser isolado das demais gorduras presentes no extrato saponificado para ser quantificado nas amostras de leite e, os valores obtidos na recuperação com o teste de adição de padrão para as amostras B e C, juntamente com os cromatogramas mais limpos, com uma boa separação de pico, inferem que  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  é eficiente e pode ser aplicado no isolamento e pré-concentração do CHO nas amostras de leite bovino.

O método aqui descrito mostrou-se fácil e rápido na determinação de CHO em amostras de leite bovino fazendo uso de pequena massa de material sorvente. O uso de um material com propriedade magnética facilitou o processo de separação da fase extratora da fase líquida, aproximando um campo magnético externo.

## 6. CONCLUSÕES

A síntese de um polímero molecularmente impresso magnético para a molécula do colesterol, empregando o método de síntese semi-covalente foi avaliada com as técnicas de caracterização e seu emprego no processo de extração em fase sólida magnética de colesterol.

A caracterização dos materiais sintetizados mostrou-se de suma importância para fazer inferências sobre a capacidade seletiva e sortiva do  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  frente à molécula do CHO, confirmando posteriormente, pelos estudos de extração e eluição que a interação do CHO com o sorvente ocorre entre os grupos hidroxilas e o grupo amino por ligações de hidrogênio.

Os grupos funcionais dos materiais de partida esperados no material final foram observados nos espectros de infravermelho, de modo especial, as bandas referentes ao óxido de ferro, a presença da sílica e os grupos amino, responsáveis pela religação do colesterol, atestando a presença desses no  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ . A rede polimérica sintetizada sob o núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou área específica elevada ( $163,18 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), com maior volume e diâmetro de poro. Ainda, essa rede polimérica, com uma maior quantidade de silício incorporada, gerou uma estrutura com características morfológicas diferentes dos demais materiais, assim como uma maior degradação com o aumento da temperatura e pequena diminuição da força magnética.

Apesar disso, observou-se que mesmo com as etapas de síntese acontecendo sob o núcleo de óxido de ferro, o núcleo magnético do material permaneceu com sua propriedade magnética, conforme os resultados de DRX e medidas de magnetização.

Essas características foram importantes para o material final, proporcionando uma rápida separação entre fase extratora e fase líquida durante os experimentos de adsorção e eluição. Ainda, proporcionaram uma rápida cinética de sorção, onde 60 segundos foram suficientes para atingir equilíbrio durante a etapa de sorção e 180 segundos na eluição CHO, com a uma elevada capacidade máxima de sorção,  $314,05 \text{ mg g}^{-1}$ .

O estudo cinético e o estudo das isotermas de sorção para o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$ , apontaram para o modelo de pseudo-segunda ordem e para o modelo Langmuir-Freundlich para dois sítios, confirmando a existência de sítios de ligação com energia de ligação diferentes e comparando-se o desempenho sortivo com o material controle,

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NIP}$ , observou-se que o  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{MIP}$  era mais seletivo ao analito, mesmo na presença de interferentes com estrutura química semelhantes ao CHO.

Com a determinação dos parâmetros analíticos para o material, obteve-se um limite de quantificação de  $11,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e limite de detecção de  $38,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , com uma precisão intra-dia e inter-dia de 1,60% e 2,46% para concentração de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de colesterol e 1,52% e 2,37% para concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de colesterol, respectivamente. Comparando-se as curvas analíticas, etapa de pré-concentração e sem etapa de pré-concentração, obteve-se um ganho de pré-concentração do material de 7,88 vezes, valores abaixo dos obtidos anteriormente na literatura e sua aplicação em amostras de leite bovino possibilitou a quantificação do CHO nessas amostras.

## 7. REFERÊNCIAS

- A.O, Dada, *et al.* Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn <sup>2+</sup> Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 38–45, 2012.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Rotulagem de alimentos**. [homepage] Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/alimentos/produtos/rotulagem> Acesso em 12 de fevereiro de 2020.
- AHMAD, I.; SIDDIQUI, W. A.; AHMAD, T. Synthesis and characterization of molecularly imprinted magnetite nanomaterials as a novel adsorbent for the removal of heavy metals from aqueous solution. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 5, p. 4239–4252, 2019.
- AHMADI, M. *et al.* Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 958, p. 1–21, 2017.
- AHMIDA, H. S. M. *et al.* Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 842, n. 1, p. 43–47, 2006.
- AHN, J. H. *et al.* Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2411–2417, 2012.
- ALAMRI, H. *et al.* Self-cleaning superhydrophobic epoxy coating based on fibrous silica-coated iron oxide magnetic nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 513, p. 349–356, 2018.
- ALBUQUERQUE, T. G. *et al.* Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 193, p. 18–25, 2016.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, 2002.
- ANIRUDHAN, T. S.; DEEPA, J. R.; BINUSSREEJAYAN. Electrochemical sensing of cholesterol by molecularly imprinted polymer of silylated graphene oxide and chemically modified nanocellulose polymer. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, p. 942–956, 2018.
- ANSARI, S. Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: Recent developments and trends. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 90, p. 89–106, 2017a.
- ANSARI, S. Combination of molecularly imprinted polymers and carbon nanomaterials as a versatile biosensing tool in sample analysis: Recent applications and challenges. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 134–151, 2017b.
- ANSARI, S.; KARIMI, M. Recent configurations and progressive uses of magnetic molecularly imprinted polymers for drug analysis. **Talanta**, v. 167, n. January, p. 470–485, 2017.

ANSELL, R. J.; MOSBACH, K. Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay. **Analyt**, v. 123, n. 7, p. 1611–1616, 1998.

ARVAND, M.; ERFANIFAR, Z.; ARDAKI, M. S. A New Core @ Shell Silica-Coated Magnetic Molecular Imprinted Nanoparticles for Selective Detection of Sunset Yellow in Food Samples. **Food Anal. Methods**, p. 2593–2606, 2017.

ASHLEY, J. *et al.* Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, n. November 2016, p. 606–615, 2017.

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

AZZOUZ, A. *et al.* Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 347–369, 2018.

BANAEI, A. *et al.* Synthesis and characterization of new modified silica coated magnetite nanoparticles with bisaldehyde as selective adsorbents of Ag(i) from aqueous samples. **RSC Advances**, v. 5, n. 101, p. 83304–83313, 2015.

BAUER, L. C. *et al.* Method validation for simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in milk by RP-HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 161–168, 2014.

BEDIN, K. C. *et al.* Bone char prepared by CO<sub>2</sub> atmosphere: Preparation optimization and adsorption studies of Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Cleaner Production**, v. 161, p. 288–298, 2017.

BEDWELL, T. S.; WHITCOMBE, M. J. Analytical applications of MIPs in diagnostic assays: future perspectives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 7, p. 1735–1751, 2016.

BEHRENS, S. Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: Recent progress and future directions. **Nanoscale**, v. 3, n. 3, p. 877–892, 2011.

BELTRAN, A. *et al.* Molecularly-imprinted polymers: Useful sorbents for selective extractions. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1363–1375, 2010.

BELTRÃO, F. A. S. *et al.* Análises físico químicas de teor de colesterol total de queijo tipo chevrotin simbiótico. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 55, n. 83, p. 1–6, 2016.

BLESSO, C. N.; FERNANDEZ, M. L. Dietary cholesterol, serum lipids, and heart disease: Are eggs working for or against you? **Nutrients**, v. 10, n. 4, 2018.

BRASIL, M. DA S. **Guia Alimentar para a População Brasileira**. disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/05/Guia-Alimentar-para-a-pop-brasiliera-Miolo-PDF-Internet.pdf>. Acesso em 28 de outubro de 2019.

ÇAĞTÜ, K. *et al.* Cholesterol removal from various samples by cholesterol-imprinted monosize microsphere-embedded cryogels. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 365–375, 2014.

CAMPOS, E. A. *et al.* Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles - A short review. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 7, n. 3, p. 267–276, 2015.

CHANG, L.; CHEN, S.; LI, X. Synthesis and properties of core-shell magnetic molecular imprinted polymers. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 17, p. 6660–6664, 2012.

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

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

CHENG, Y. *et al.* Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for selective recognition and determination of quercetin in apple samples. **Food Chemistry**, v. 287, n. February, p. 100–106, 2019.

CHOU, L. C. S.; LIU, C. C. Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 110, n. 2, p. 204–208, 2005.

CLAUSEN, D. N. **DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E MATERIAIS ADSORVENTES BASEADOS EM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS E NANOESTRUTURADOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO E ALIMENTÍCIO**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T. Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA-SiO<sub>2</sub>) hybrid material synthesized with different molar ratios. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 99–108, 2014.

CLAUSEN, D. N.; VISENTAINER, J. V.; TARLEY, C. R. T. Development of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica for clean-up and selective extraction of cholesterol in milk prior to analysis by HPLC-UV. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 5021–5027, 2014.

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

CORTÉS-HERRERA, C. *et al.* Liquid Chromatography Analysis of Common Nutritional Components, in Feed and Food. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 1, 2018.

CUNHA, C. *et al.* Hybrid composites made of multiwalled carbon nanotubes functionalized with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for tissue engineering applications. **Nanotechnology**, v. 23, n. 46, 2012.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 4, p. 456–460, 2009.

DENG, Q.; WANG, S. ( MIPs ) – an emerging technique determination. **Food**

**Chemical Hazard Detection: Development and Application of New Technologies**, v. 1, 2014.

DIETSCHY, J. M.; SIPERSTEIN, M. D. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. **J Lipid Res**, v. 8, n. 2, p. 97–104, 1967.

DINIZ, K. M.; TARLEY, C. R. T. Speciation analysis of chromium in water samples through sequential combination of dispersive magnetic solid phase extraction using mesoporous amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles and cloud point extraction. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 185–195, 2015.

EWEN, S. L.; STEINKE, J. H. G. Molecularly imprinted polymers using anions as templates. **Structure and Bonding**, v. 129, n. April, p. 207–248, 2008.

FAN, J. P. *et al.* Preparation and characterization of molecular imprinted polymer functionalized with core/shell magnetic particles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@MIP) for the simultaneous recognition and enrichment of four taxoids in Taxus media. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 567–577, 2015.

FAN, J. P. *et al.* Preparation, characterization, and application of multiple stimuli-responsive rattle-type magnetic hollow molecular imprinted poly (ionic liquids) nanospheres (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@void@PILMIP) for specific recognition of protein. **Chemical Engineering Journal**, v. 337, n. January, p. 722–732, 2018.

FAYE, B. *et al.* Comparative milk and serum cholesterol content in dairy cow and camel. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 2, p. 168–175, 2015.

FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1–2, p. 369–388, 1992.

FLETOURIS, D. J. *et al.* Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 2833–2840, 2010.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 2–10, 2010.

GORBAN, A. M. S.; IZZELDIN, O. M. Study on cholesteryl ester fatty acids in camel and cow milk lipid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 229–234, 1999.

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

GUNNLAUGSDOTTIR, H.; ACKMAN, R. G. Three extraction methods for determination of lipids in fish meal: Evaluation of a hexane/isopropanol method as an alternative to chloroform-based methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 235–240, 1992.

GUPTA, R.; KUMAR, A. Synthesis and characterization of sol-gel-derived molecular imprinted polymeric materials for cholesterol recognition. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 182–194, 2011.

HANSEN, H.; WANG, T. Does the Saponification-GC Method Underestimate Total

Cholesterol Content in Samples Having Considerable Cholesterol Esters? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 11–12, p. 1735–1738, 2015.

HASSAN, A. H. A. *et al.* Biosensors and Bioelectronics Electrochemical sensing of methyl parathion on magnetic molecularly imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 118, n. June, p. 181–187, 2018.

HU, Y. *et al.* Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 37–52, 2013.

HU, Y. W.; ZHENG, L.; WANG, Q. Regulation of cholesterol homeostasis by liver X receptors. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 9–10, p. 617–625, 2010.

HWANG, C. C.; LEE, W. C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. **Journal of Chromatography A**, v. 962, n. 1–2, p. 69–78, 2002.

INANAN, T. *et al.* Selective cholesterol adsorption by molecular imprinted polymeric nanospheres and application to GIMS. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 451–460, 2016.

JEAN D. WILSON, CHARLES A. LINDSEY, AND J. M. D. Influence of Dietary Cholesterol on Cholesterol Metabolism. A. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 1–6, 2000.

JIANG, H. *et al.* Biosensors and Bioelectronics Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles based electrochemical sensor for the measurement of Gram-negative bacterial quorum signaling molecules ( N-acyl-homoserine-lactones ). **Biosensors and Bioelectronic**, v. 75, p. 411–419, 2016.

KARDANI, F.; MIRZAJANI, R.; RAMEZANI, Z. Direct cholesterol and  $\beta$ -sitosterol analysis in food samples using monolithic molecularly-imprinted solid-phase microextraction fibers coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, n. 12, p. 2877–2888, 2018.

KARIMI, M. A.; RANJBAR, M.; AKBARPOOR, M. Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Selective Adsorption and Separation of  $\beta$ -Estradiol. **Journal of Cluster Science**, v. 27, n. 3, p. 1067–1080, 2016.

KHAN, S. *et al.* Synthesis and characterization of magnetic-molecularly imprinted polymers for the HPLC-UV analysis of ametryn. **Reactive and Functional Polymers**, v. 122, n. July, p. 175–182, 2018.

KHOSROSHAHI, M. E.; GHAZANFARI, L. Synthesis and functionalization of SiO<sub>2</sub> coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with amine groups based on self-assembly. **Materials Science & Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1043–1049, 2012.

KI, C. DO *et al.* The use of a thermally reversible bond for molecular imprinting of silica spheres. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 14838–14839, 2002.

KUDR, J. *et al.* Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, 2017.

KWAŚNIEWSKA, K.; GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; BUSZEWSKI, B. Magnetic molecular imprinted polymers as a tool for isolation and purification of biological

samples. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1228–1235, 2015.

LAHCEN, A. A. *et al.* Synthesis and electrochemical characterization of nanostructured magnetic molecularly imprinted polymers for 17- $\beta$ -Estradiol determination. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 241, p. 698–705, 2017.

LANÇAS, F. M. Scientia Chromatographica. **Scientia Chromatographica**, v. 0, p. 17–44, 2008.

LANGSTED, A.; NORDESTGAARD, B. G. Nonfasting versus fasting lipid profile for cardiovascular risk prediction. **Pathology**, v. 51, n. 2, p. 131–141, 2019.

LEE, W. C.; HUNG, C. Y.; HWANG, C. C. Separation of Cholesterol from other Steroids Using Molecularly Imprinted Polymer Prepared by Seeded Suspension Polymerization Separation of Cholesterol from Other Steroids Using Molecularly Imprinted Polymer Prepared by Seeded Suspension Polymerization. **Chemical Biochem. Eng. Q.**, n. June 2008, 2009.

LI, G.; ROW, K. H. Applications of Magnetic Molecularly Imprinted Polymers (MMIPs) in the Separation and Purification Fields. **Chromatographia**, v. 81, n. 1, p. 73–88, 2018.

LI, L. H. *et al.* Analytical methods for cholesterol quantification. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 375–386, 2019.

LI, N. *et al.* Preparation of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for recognition of bovine hemoglobin. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 4, n. 2, p. 286–293, 2009.

LI, Y. S. *et al.* Preparation and characterization of silica coated iron oxide magnetic nano-particles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 76, n. 5, p. 484–489, 2010.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.

LUZÓN-TORO, B.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of brain levels of  $\alpha$ -cholest-8-en-3 $\beta$ -ol (lathosterol). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1–2, p. 177–182, 2007.

MADHURI, R. *et al.* Combination of Molecular Imprinting and Nanotechnology: Beginning of a New Horizon. **Advanced Biomaterials and Biodevices**, v. 9781118773, p. 367–422, 2014.

MAK YU, T. *et al.* Exploring the surface reactivity of the magnetic layered double hydroxide lithium-aluminum: An alternative material for sorption and catalytic purposes. **Applied Surface Science**, v. 467–468, n. July 2018, p. 1195–1203, 2019.

MALIK, M. I. *et al.* Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry. **Separation and Purification Reviews**, v. 48, n. 3, p. 179–219, 2019.

MALITESTA, C. *et al.* MIP sensors - The electrochemical approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 5, p. 1827–1846, 2012.

MARESTONI, L. D. *et al.* Polímeros impressos com íons: Fundamentos, estratégias

de preparo e aplicações em química Analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194–1207, 2013.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 169–170, 2013.

MATOS CORDEIRO BORGES, M.; LEIJOTO DE OLIVEIRA, H.; BASTOS BORGES, K. Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with LC–APCI–MS–MS for the selective determination of serum cholesterol. **Electrophoresis**, v. 38, n. 17, p. 2150–2159, 2017.

MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1742–1778, 2005.

MENDONÇA, E. S. D. T. DE *et al.* Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Surfaces and Interfaces**, v. 14, n. November 2018, p. 34–43, 2019.

NASCIMENTO, T. A. DO; OLIVEIRA, H. L. DE; BORGES, K. B. Magnetic molecularly imprinted polypyrrole as a new selective adsorbent for pharmaceutically active compounds. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 103371, 2019.

NEZHADALI, A.; ES'HAGHI, Z.; KHATIBI, A. D. Selective Extraction of Cholesterol from Dairy Samples Using a Polypyrrole Molecularly Imprinted Polymer and Determination by Gas Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 1397–1407, 2017.

NI, X. *et al.* Silica-coated iron nanoparticles: Shape-controlled synthesis, magnetism and microwave absorption properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 120, n. 1, p. 206–212, 2010.

OLIVEIRA, F. M. DE. **Preparo, Caracterização E Aplicação De Um Novo Sorvente Baseado Em Polímero Molecularmente Impresso Com Acesso Restrito Para Extração De Ácido Fólico Em Amostras De Leite**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

OLIVEIRA, F. M. DE; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T. Hybrid molecularly imprinted poly(methacrylic acid-TRIM)-silica chemically modified with (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane for the extraction of folic acid in aqueous medium. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 643–651, 2016.

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, n. 3, p. 656–665, 2016.

OLIVEIRA, H. L. DE *et al.* Novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymer for selective magnetic solid-phase extraction of estrogens from human urine. **Microchemical Journal**, p. 104043, 2019.

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

POLYAKOVA, I. *et al.* Surface molecularly imprinted organic-inorganic polymers having affinity sites for cholesterol. **Reactive and Functional Polymers**, v. 109, p. 88–98, 2016.

POLYAKOVA, I. V. *et al.* Synthesis and properties of polymeric and organo-inorganic amphiphilic sorbents molecularly imprinted with cholesterol. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 1617–1626, 2015.

Portaria MAPA 146, de 07/03/1993 **REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO LEITE UAT (UHT)**. [homepage] disponível em <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>. Acesso em 12 de fevereiro de 2020.

PRETE, M. C. **AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES MOLARES DE COMPONENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS NO DESENVOLVIMENTO DE UM POLÍMERO HÍBRIDO (POLIVINILPIRIDINA/SIO<sub>2</sub> /APTMS) E SEU EFEITO NA SORÇÃO DE BISFENOL A EM MEIO AQUOSO**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

PUOCI, F. *et al.* Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of cholesterol from aqueous environment. **E-Polymers**, n. 013, p. 1–9, 2007.

PUOCI, F. *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. **Food ChemistryPuoci**, v. 106, n. 2, p. 836–842, 2008.

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

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M. *et al.* Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361–380, 2017.

SCHIRHAGL, R. Bioapplications for molecularly imprinted polymers. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 250–261, 2014.

SEMIH ÖTLES; KARTAL, C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 1, p. 5–15, 2016.

SHARAFI, Z. *et al.* Synthesis of silica-coated iron oxide nanoparticles: Preventing aggregation without using additives or seed pretreatment. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 386–395, 2018.

SHI, S. *et al.* Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 485–493, 2014.

SHI, Y. *et al.* Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 42, p. 549–555, 2006.

SILVA, M. F.; PINEDA, E. A. G.; BERGAMASCO, R. Application of Nanostructured Iron Oxides As Adsorbents and Photocatalysts for Wastewater Pollutant Removal. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 393–398, 2014.

SOLIMAN, G. A. Dietary cholesterol and the lack of evidence in cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 10, n. 6, 2018.

SONG, X. *et al.* Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, p. 1–18, 2014.

SPELTINI, A. *et al.* Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 974, p. 1–26, 2017.

SU, X. *et al.* Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and determination of Rhodamine B in food. **Food Chemistry**, v. 171, p. 292–297, 2015.

TANG, X. *et al.* Synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers with excellent biocompatibility for the selective separation and inhibition of testosterone in prostate cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2979–2993, 2017.

THOMMES, M. *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, 2015.

TOIVO, J. *et al.* Determination of sterols in foods: Recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 6, p. 631–643, 2001.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Lowering Your Cholesterol With TLC (Therapeutic Lifestyle Changes)** National Heart, Lung, and Blood Institute. [homepage] Disponível em [https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/public/heart/chol\\_tlc.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/public/heart/chol_tlc.pdf). Acesso em 23 de setembro de 2019.

WANG, L. *et al.* Molecularly imprinted polymers for gossypol via sol-gel, bulk, and surface layer imprinting-A comparative study. **Polymers**, v. 11, n. 4, 2019.

WANG, X. *et al.* A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 327–332, 2009.

WANG, Y. F. *et al.* Synthesis and characterization of magnetic molecularly imprinted polymer for the enrichment of ofloxacin enantiomers in fish samples. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016.

WEGMANN, M.; SCHARR, M. **Chapter 8 - Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles**. Precision medicine: tools and quantitative approaches. p. 145 - 181. 2018.

WHITCOMBE, M. J. *et al.* A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 27, p. 7105–7111, 1995.

WHITE, L. D.; TRIPP, C. P. Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 232, n. 2, p. 400–407, 2000.

WILLIAM, G. K. *et al.* Modelling of Adsorption Kinetic Processes—Errors, Theory and

Application. **Advanced Sorption Process Applications**, v 1, p. 1-20, 2016.

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Initial behavior of intraparticle diffusion model used in the description of adsorption kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 153, n. 1–3, p. 1–8, 2009.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.

XIE, L. *et al.* Novel molecular imprinted polymers over magnetic mesoporous silica microspheres for selective and efficient determination of protocatechuic acid in *Syzygium aromaticum*. **Food Chemistry**, v. 178, p. 18–25, 2015.

YAMAURA, M. *et al.* Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, n. 2–3, p. 210–217, 2004.

YAN, H.; KYUNG, H. R. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, n. 5–6, p. 155–178, 2006.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 960, p. 1–17, 2017.

YAVUZ, H. *et al.* Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 8–15, 2007.

YUAN, L. *et al.* Preparation of estriol-molecularly imprinted silica nanoparticles for determining oestrogens in milk tablets. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1063–1068, 2012.

YUAN, Y. *et al.* Preparation of core-shell magnetic molecular imprinted polymer with binary monomer for the fast and selective extraction of bisphenol A from milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1462, p. 2–7, 2016.

ZAYED, M. A. *et al.* Spectrophotometric analysis of hematite/magnetite nanocomposites in comparison with EDX and XRF techniques. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 288–295, 2017.

ZENGIN, A. *et al.* Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. **Analyst**, v. 138, n. 23, p. 7238–7245, 2013.

ZHAO, X. *et al.* Preparation of silica-magnetite nanoparticle mixed hemimicelle sorbents for extraction of several typical phenolic compounds from environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 140–147, 2008.