



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
POLÍMERO IONICAMENTE IMPRESSO COM ACESSO
RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE
Cd²⁺ E SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE MACROMOLÉCULAS**

Londrina
2020

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
POLÍMERO IONICAMENTE IMPRESSO COM ACESSO
RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE
Cd²⁺ E SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE MACROMOLÉCULAS**

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado Associado em Química–UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Londrina
2020

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

D278 de Oliveira, Leandro Luan Gonçalves .
Síntese, caracterização e aplicação de polímero ionicamente impresso com acesso restrito para a extração/pré-concentração de Cd²⁺ e simultânea exclusão de macromoléculas / Leandro Luan Gonçalves de Oliveira. - Londrina, 2020.
112 f.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Polímero Ionicamente Impresso - Tese. 2. Material de Acesso Restrito - Tese. 3. Cádmio e Ácido Húmico - Tese. 4. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
POLÍMERO IONICAMENTE IMPRESSO COM ACESSO
RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE
Cd²⁺ E SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE MACROMOLÉCULAS**

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado Associado em Química–UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr^a. Maria Josefa Santos Yabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Londrina, 10 de dezembro de 2020.

OLIVEIRA, Leandro Luan Gonçalves. **Síntese, Caracterização e Aplicação de Polímero Ionicamente Impresso com Acesso Restrito para a Extração/Pré-concentração de Cd²⁺ e Simultânea Exclusão de Macromoléculas**. 2020. 111 f. Trabalho de obtenção do título de doutor - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Um polímero ionicamente impresso com acesso restrito foi sintetizado e avaliado como sorvente para a pré-concentração de Cd²⁺ e simultânea exclusão de Ácido Húmico (AH). O polímero impresso com acesso restrito foi avaliado usando os comonômeros 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) assim como por meio do revestimento da superfície com a albumina de soro bovino (BSA). Os sorventes sintetizados foram caracterizados por Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Elementar CHNS, Análise Termogravimétrica (TGA), análise textural, *Swelling Effect* (SE) e molhabilidade. Ao comparar o IIP-HEMA com e sem recobrimento de BSA, os resultados demonstraram que apesar de igualmente eficientes na exclusão de ácido húmico (AH), o IIP-HEMA-BSA não demonstrou seletividade para o Cd²⁺ na presença de Pb²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺. Apesar de seletivo, o polímero sem cobertura hidrofílica IIP não foi capaz de excluir eficientemente o AH. Por outro lado, a inserção de HEMA foi suficiente para obter um polímero seletivo para o Cd²⁺ e com acesso restrito a substância húmica. Sob as condições otimizadas de vazão de pré-concentração (7,5 mL min⁻¹), massa de adsorvente (100,0 mg), eluente (HNO₃ 2,0 mol L⁻¹) e tampão tris-HCl (0,01 mol L⁻¹) pH 8,70 o IIP-HEMA foi capaz de excluir 5,0 mg L⁻¹ de AH na presença de Cd²⁺. Os limites de detecção e quantificação obtido foram de 0,17 µg L⁻¹ e 0,56 µg L⁻¹, respectivamente, para uma faixa linear de 0,56-50,0 µg L⁻¹. Outros parâmetros analíticos do método incluem o fator de pré-concentração (37 vezes), índice de consumo (0,54 mL), eficiência de pré-concentração (13,1 min⁻¹) e frequência analítica (21 h⁻¹). A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade intra (n=10) e inter dia (n=2) e o desvio padrão relativo obtido em dois níveis de concentração na presença e ausência de AH foram menores que 4,68 %. A exatidão do método foi realizada por meio de testes de adição e recuperação em amostras de água naturais em dois níveis de concentração obtendo porcentagens de recuperação na faixa de 92,0-108,7%. Para demonstrar a aplicabilidade do método, o polímero foi aplicado satisfatoriamente para a determinação de cádmio em amostras de alimento (linhaça, 301,8±15,3, 278,3±11,7 e 953,6±38,6 µg kg⁻¹), fitoterápico (*Ginkgo biloba*, 221,2 ± 5,8 µg kg⁻¹) e cigarro (77,9 ± 6,3 µg kg⁻¹). Em todos os casos, as recuperações confirmaram a confiabilidade do método proposto. A exatidão do método foi verificada também pela determinação de cádmio no material certificado TORT-2 (hepatopancreas de lagosta).

Palavras-chave: polímero ionicamente impresso; material de acesso restrito; cádmio; ácido húmico; espectrometria de absorção atômica em chama.

OLIVEIRA, Leandro Luan Gonçalves. **Synthesis, Characterization and Application of Restricted Access Material-Ion Imprinted Polymer for Cd²⁺ Extraction/Pre-concentration and Simultaneous Exclusion of Macromolecules**. 2020. 111 p. Trabalho de obtenção do título de doutor - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

A restricted access cadmium ion-imprinted was synthesized and evaluated as a sorbent for Cd²⁺ preconcentration with simultaneous exclusion of humic acid (HA). Restricted access medium-ion imprinted polymer was assessed by using the co-monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as well as by surface coating with bovine serum albumin (BSA). A set of techniques were used for sorbent characterization including, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), CHNS elemental analysis, Thermogravimetric Analysis (TGA) and textural analysis to obtain textural data, swelling effect analysis (SE) and wettability. IIP modified with HEMA and IIP modified with HEMA-BSA, compared with IIP showed better performance in binding Cd²⁺ and simultaneous HA exclusion. The obtained results demonstrate that IIP-HEMA with and without BSA coating were equally efficient in the exclusion of humic acid (AH), although IIP-HEMA-BSA showed no selectivity for Cd²⁺ in the presence of Pb²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺. In spite of selective, the polymer without hydrophilic cover was not able to efficiently AH exclusion. On the other hand, the HEMA insertion was sufficient to obtain a selective polymer with restricted access for Cd²⁺ determination in the presence of AH. Under optimized conditions, preconcentration flow rate (7.5 mL min⁻¹), sorbent mass (100.0 mg), eluent (2.0 mol L⁻¹ HNO₃) and tris-HCl buffer (0.01 mol L⁻¹) pH 8.70 the IIP-HEMA was able to exclude 5.0 mg L⁻¹ of AH in the presence of Cd²⁺. Other figures of merit include the preconcentration factor (37-folds), consumption of index (0.54 mL), preconcentration efficiency (13.1 min⁻¹) and analytical frequency (21 h⁻¹). The precision of the method was evaluated in terms of intra-day (n=10) and inter-day (n=2) repeatability and the relative standard deviation obtained by two-level concentration in the presence and absence of HA was less than 4,68 %. The accuracy was performed by addition and recovery tests of Cd²⁺ in real water samples in two-level concentration, obtaining recovery percentages in the range of 92,0-108,7%. To demonstrate the applicability of the method, the polymer was applied satisfactorily for cadmium determination in food (linseed, 301.8±15.3, 278.3±11.7 and 953.6±38.6 µg kg⁻¹), herbal medicines (Ginkgo biloba, 221.2 ± 5.8 µg kg⁻¹) and cigarette samples (77.9 ± 6.3 µg kg⁻¹). In all cases, the spike recoveries confirmed the reliability of the proposed method. Moreover, the accuracy was successful attested by analysis of certified reference material TORT-2 (lobster hepatopancreas).

Key words: ion imprinted polymer; restricted access material; cadmium; humic acid; flame atomic absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Estrutura química dos comonômeros hidrofílicos utilizados como modificadores para a obtenção de materiais com acesso restrito..... | 15 |
| Figura 2. | Porcentagem de trabalhos publicados de polímeros RAMs (1987-2018), MIP (1989-2018), IIP (1991-2018), MIP-RAM (1999-2018) e IIP-RAM (2013-2018)..... | 17 |
| Figura 3. | Representação esquemática da síntese dos polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA..... | 23 |
| Figura 4. | Representação ilustrativa do sistema FIA-FAAS desenvolvido para a pré-concentração de Cd^{2+} e simultânea exclusão de AH..... | 30 |
| Figure 5. | Espectros de FT-IR do ligante bifuncional ATU e dos adsorventes IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA na (a) ausência e (b) presença do íon template (Cd^{2+})..... | 40 |
| Figura 6. | Curvas termogravimétricas e a derivada das curvas termogravimétricas obtidas para os polímeros na (a) presença e (b) ausência do cádmio. | 43 |
| Figura 7. | Microscopia Eletrônica de Varredura obtida para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA com ampliação de 70 e 30000 vezes..... | 46 |
| Figura 8. | Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e mapeamento dos átomos de enxofre e cádmio obtido para os polímeros IIP- Cd^{2+} , IIP-HEMA- Cd^{2+} e IIP-HEMA-BSA- Cd^{2+} | 49 |
| Figura 9. | Imagem da gota séssil sobre a superfície do polímero obtida sobre o fundo totalmente escuro. | 52 |
| Figura 10. | Imagens de contato entre a microgota de água e a superfície dos polímeros em diferentes tempos. | 53 |
| Figura 11. | Mecanismo de determinação do p_{cz} dos polímeros obtido a partir da titulação potenciométrica..... | 56 |
| Figura 12. | Curva de titulação obtida para 15,0 mg de cada polímero em NaOH ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) titulado com HCl ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O círculo representa o primeiro e o segundo pontos de inflexão ($pH_{p_{cz}}$) de cada material..... | 57 |
| Figure 13. | Influência do pH na sorção de cádmio para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} tamponadas em acetato (pH 5,70), fosfórico (pH 6,70), tris-HCl (pH 7,70 e 8,70) e amônio (pH 9,70) com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ | 58 |
| Figura 14. | Equilíbrio tautomérico tiol/tiona/tiolato do grupo tioureia ($NH-C=S$) presentes na rede polimérica..... | 60 |
| Figura 15. | Efeito do pH na taxa de sorção de cádmio na presença de AH. Condições: $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} na presença de AH $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ tamponadas em acetato (pH 5,70), fosfórico (pH 6,70), tris-HCl (pH 7,70 e 8,70) e amônio (pH 9,70) com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ | 62 |

| | |
|---|----|
| Figure 16. Efeito da concentração de HA na taxa de sorção de Cd ²⁺ obtida para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: pH 8,70, 50,0 µg L ⁻¹ de Cd ²⁺ na presença de HA 1,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 e 100,0 mg L ⁻¹ | 64 |
| Figura 17. Mecanismo de interação entre o AH e o cádmio..... | 65 |
| Figura 18. Espectros de absorção molecular na região do UV obtidos para o efluente IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: solução de Cd ²⁺ 50,0 µg L ⁻¹ na presença de AH 5,0 mg L ⁻¹ obtidas em pH 5,70, 6,70, 7,70, 8,80. | 67 |
| Figura 19. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na pré-concentração de cádmio usando como resposta (a) Abs e (b) ES. | 73 |
| Figura 20. Gráfico dos efeitos <i>versus</i> valor de z obtido para (a) Abs e (b) ES. Os efeitos negligenciáveis estão próximos do zero no eixo x e os efeitos importantes (MA e VP) estão afastados do zero. | 75 |
| Figura 21. Superfície de Resposta do efeito de interação VP x MA para a mudança da variável resposta (a) Abs para (b) ES. | 77 |
| Figura 22. Avaliação da linearidade do método de extração/pré-concentração de Cd ²⁺ | 84 |
| Figura 23. Curvas analíticas obtidas para o IIP-HEMA (a) com (0,56-50,0 µg L ⁻¹) e (b) sem a etapa de pré-concentração (50,0-1000,0 µg L ⁻¹) na ausência e presença de AH 5,0 e 50,0 mg L ⁻¹ | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1. | Gradiente de temperatura utilizado para o procedimento de digestão ácida por microondas das amostras de cigarro, <i>Ginkgo biloba</i> e linhaça. | 37 |
| Tabela 2. | Parâmetros texturais obtidos para os polímeros antes e após a remoção do cádmio. | 47 |
| Tabela 3. | Determinação da percentagem molar (mmol %) da ATU, EGDMA e HEMA na estrutura do polímero usando análise elementar por CHNS. | 51 |
| Tabela 4. | Hidrofilicidade da superfície dos polímeros com base no efeito inchaço (EI)..... | 54 |
| Table 5. | Parâmetros de seletividade para a sorção competitiva de Cd ²⁺ /Pb ²⁺ , Cd ²⁺ /Zn ²⁺ , Cd ²⁺ /Cu ²⁺ , Cd ²⁺ /Ni ²⁺ e Cd ²⁺ /Co ²⁺ sobre a superfície dos polímeros com e sem impressão química. | 69 |
| Tabela 6. | Classificação de ácidos e bases moles e duros | 70 |
| Tabela 7. | Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁵⁻¹ utilizado na otimização para a pré-concentração de Cd ²⁺ utilizando o Sistema FIA-FAAS. | 72 |
| Tabela 8. | Comparação entre as análises de variância dos modelos lineares para a Abs e ES..... | 78 |
| Tabela 9. | Efeito de Cátions interferentes na taxa de pré-concentração de Cd ²⁺ na presença e ausência de AH 5,0 mg L ⁻¹ | 81 |
| Tabela 10. | Efeito de ânions interferentes na taxa de pré-concentração de Cd ²⁺ na presença e ausência de AH 5,0 mg L ⁻¹ | 83 |
| Tabela 11. | Análise de variância para o ajuste do modelo de regressão linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a relação absorvância e concentração de Cd ²⁺ | 85 |
| Tabela 12. | Variáveis de entrada e análise de variância para os <i>slopes</i> das curvas analíticas obtidas na ausência e presença da substância húmica. | 91 |
| Tabela 13. | Teste de Tukey para a comparação entre as médias dos <i>slopes</i> das curvas analíticas. | 92 |
| Tabela 14. | Parâmetros analíticos para a determinação de Cd ²⁺ utilizando o método proposto. | 93 |
| Tabela 15. | Comparação entre o método proposto e diferentes polímeros impressos para a determinação de Cd ²⁺ | 94 |
| Tabela 16. | Teste de adição e recuperação em amostras de água. | 96 |
| Tabela 17. | Quantificação de cádmio em amostras de cigarro, linhaça e <i>Ginkgo biloba</i> | 97 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | EXPERIMENTAL..... | 21 |
| 2.1 | REAGENTES E SOLUÇÕES | 21 |
| 2.2 | SÍNTESE DOS POLÍMEROS | 22 |
| 2.2.1 | Síntese dos polímeros IIP e IIP-HEMA | 22 |
| 2.2.2 | Ancoramento da BSA na superfície do polímero IIP-HEMA | 22 |
| 2.3 | INSTRUMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS..... | 24 |
| 2.3.1 | Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR) | 24 |
| 2.3.2 | Análise textural (Área superficial, Tamanho e Volume de poros) | 24 |
| 2.3.3 | Morfologia e Composição Elementar (MEV e EDS)..... | 25 |
| 2.3.4 | Análise Elementar CHNS..... | 25 |
| 2.3.5 | Análise Termogravimétrica (TGA)..... | 26 |
| 2.4 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA HIDROFILICIDADE DOS POLÍMEROS | 26 |
| 2.4.1 | Ensaio de Molhabilidade..... | 26 |
| 2.4.2 | Swelling Effect (SE)..... | 26 |
| 2.5 | PONTO DE CARGA ZERO (P_{Cz})..... | 27 |
| 2.6 | ESTUDOS DE SELETIVIDADE..... | 27 |
| 2.7 | SISTEMA FIA-FAAS DESENVOLVIDO PARA A EXTRAÇÃO/PRÉ- CONCENTRAÇÃO ONLINE DE Cd^{2+} COM SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE AH | 28 |
| 3 | DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO..... | 32 |
| 3.1 | ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO: PLANEJAMENTO FATORIAL..... | 32 |
| 3.2 | EFICIÊNCIA DE SENSIBILIDADE (ES) | 33 |
| 3.3 | PARÂMETROS ANALÍTICOS | 33 |
| 3.4 | EFEITO DE ÍONS INTERFERENTES..... | 36 |
| 3.5 | PREPARO DE AMOSTRA | 36 |
| 3.5.1 | AMOSTRAS DE ÁGUA | 36 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS IIP, IIP-HEMA E IIP-HEMA-BSA | 39 |
| 4.1.1 | Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)..... | 39 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.1.2 | Análise Termogravimétrica (TG)..... | 42 |
| 4.1.3 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Fisissorção de N ₂ | 46 |
| 4.1.4 | Mapeamento e Distribuição Elementar obtida por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)..... | 48 |
| 4.1.5 | Análise Elementar CHNS..... | 50 |
| 4.2 | HIDROFILICIDADE E EFEITO DE INCHAÇO | 52 |
| 4.3 | PONTO DE CARGA ZERO (P_{cz})..... | 55 |
| 4.4 | EFEITO DO PH NA SORÇÃO DE CÁDMIO | 58 |
| 4.5 | EFEITO DO PH NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO E SIMULTÂNEA EXCLUSÃO DE ÁCIDO HÚMICO (AH)..... | 61 |
| 4.6 | EFEITO DOS MODIFICADORES HEMA E BSA NA SELETIVIDADE DO POLÍMERO IIP | 68 |
| 4.7 | OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2⁵⁻¹..... | 70 |
| 4.8 | INTERFERENTES..... | 81 |
| 4.9 | PARÂMETROS ANALÍTICOS | 83 |
| 5 | APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO..... | 95 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 98 |
| | REFERÊNCIAS..... | 100 |

1 INTRODUÇÃO

Cádmio é conhecido como um dos elementos mais tóxicos e de efeitos indesejáveis a saúde humana, uma vez que não possui nenhuma função fisiológica no organismo humano. As principais fontes de exposição humana ao cádmio, são a água e os alimentos, sobretudo pela atividade humana e industrial [1]. Diversos estudos no último século mostram a conexão entre a intoxicação por cádmio e a ocorrência do chamado Itai-Itai ou dói-dói, que é a denominação da tradução da expressão “ouch-ouch” que significa dor nos ossos. Com uma combinação de osteomalácia e a osteoporose, Itai-Itai é a doença crônica mais severa causada pela ingestão prolongada do cádmio [2,3]. Caracterizada por múltiplas fraturas espontâneas causadas pela substituição do cálcio pelo cádmio na estrutura óssea, é responsável pelo baixo grau de mineralização óssea nos portadores desta doença [4-7].

Os Estados Unidos na tentativa de reduzir os níveis de exposição mensal ao cádmio criou a união entre a *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO) [8] que estabelece um nível máximo permitido de concentração de $4,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a ingestão mensal de cádmio por uma pessoa adulta. Para as águas destinadas ao consumo humano, segundo as diretrizes da *U.S. Department of Health and Human Services* [9] o valor máximo permitido para o cádmio em água doce é de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que na *European Commission* (EC) [10] e *US Environmental Protection Agency* (EPA) este valor é de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [11]. Segundo a WHO, a concentração de cádmio em água potável deve ser menor que $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [12]. Além disso, agências internacionais como a *International Agency Research for Cancer* (IARC) [13] classifica o cádmio e seus compostos como carcinogênicos, com evidências suficientes da relação entre o câncer de pulmão

(inalação), rim, fígado e próstata (ingestão).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) a partir das resoluções nº 357 de 17 de março de 2005 e a nº 396 de 3 de abril de 2008 que dispõem sobre as condições e padrão de qualidade da água superficial e subterrânea destinadas ao consumo, estabelecem valores máximos permitidos de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente [14,15].

Deste modo, o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a quantificação de cádmio em amostras alimentícias e água é uma importante área de pesquisa para que agências regulamentadoras e órgãos de saúde possam monitorar a concentração de cádmio em diferentes matrizes [16]. Nesse sentido, a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) tem sido amplamente empregada no monitoramento e quantificação de metais pesados. No entanto, a quantificação direta de cádmio em amostras complexas sem o tratamento prévio é muitas vezes um desafio, devido à falta de detectabilidade de metais em níveis traço ($\mu\text{g L}^{-1}$) e ao efeito de matriz pela presença de matéria orgânica natural (NOMs) em amostras ambientais. A presença de macromoléculas podem resultar em limitações instrumentais, sobretudo pela formação de fuligem no queimador, prejudicando o sistema e diminuindo a intensidade de sinal analítico [17,18].

Componentes comum da NOMs, os ácidos húmicos (AH) são formados a partir da degradação da matéria orgânica (vegetal e animal), e geralmente encontrados em águas naturais em uma faixa de concentração que pode variar de 0,1 a 100,0 mg L^{-1} . Com um grande número de grupos orgânicos funcionais e potencial para a complexação com uma variedade de metais, a substância húmica tem sido um dos grandes obstáculos para a quantificação direta de metais em amostra de águas naturais [19]. Dessa forma, o preparo de amostra por meio de

etapas de extração e pré-concentração é frequentemente necessário para tornar a matriz compatível com a técnica analítica [20,21,22].

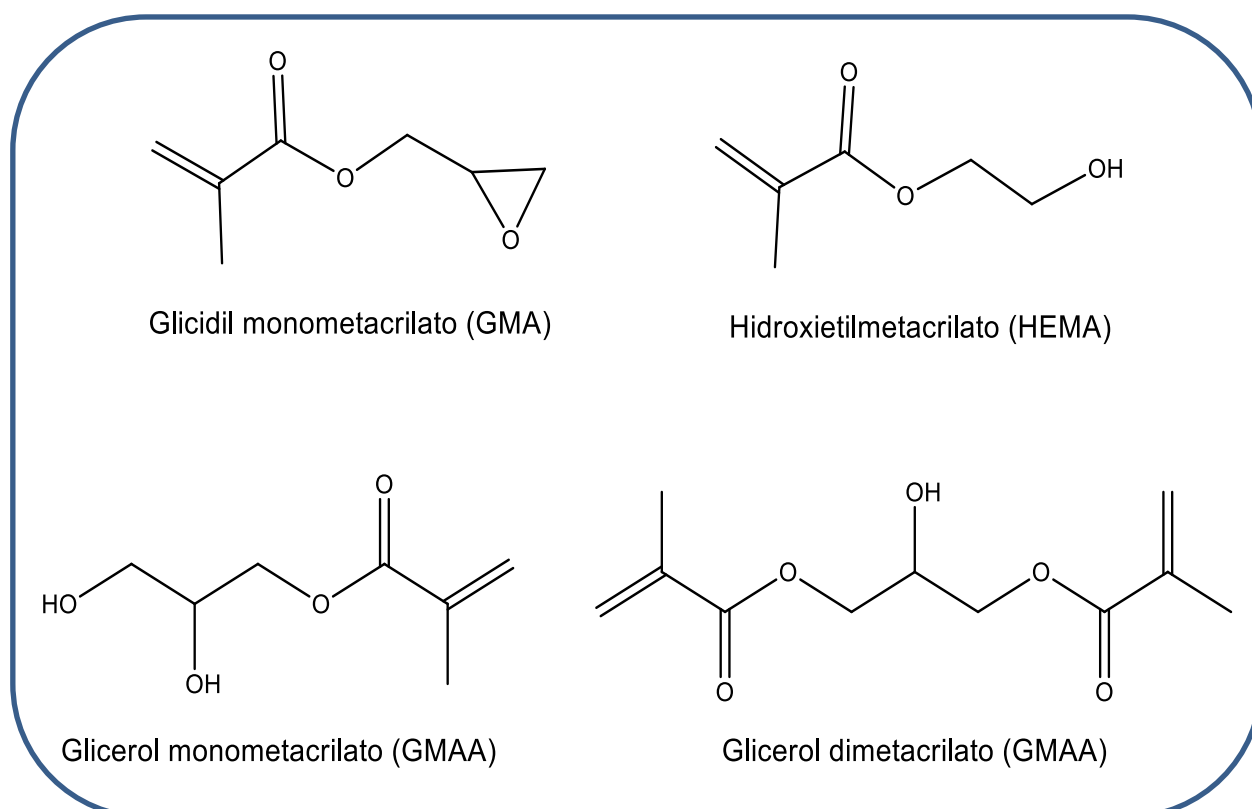
Assim, para minimizar o efeito de interferência da substância húmica, tratamento da amostra baseado em processos de precipitação ou por decomposição prévia da matriz orgânica empregando procedimentos de mineralização em blocos digestores ou digestão assistida empregando condições drásticas de temperatura, pressão e elevado consumo de ácidos em meios fortemente oxidantes, são os métodos mais empregados para a análise de metais [23,24]. Além de complexa, a decomposição da matriz é demorada, muitas das vezes ineficientes para extrair os metais e eliminar os interferentes, além de suscetível à perda do analito e contaminação [25,26].

Sendo assim, os métodos de pré-concentração do analito baseado em Extração em Fase Sólida (SPE) para o *clean-up* de amostras complexas e simultânea extração do analito de interesse têm se tornado uma alternativa aos procedimentos de mineralização [27,28]. Mesmo assim, a maioria dos sorventes comerciais de SPE convencionais, como o C18, resinas de troca catiônica e aniônica, nanotubos de carbono (CNT) e carvão ativado não são seletivos e retêm grande quantidade da matriz e ainda apresentam baixa reusabilidade. Uma vez retidas sobre a superfície do sorvente as substância húmicas impossibilitam a regeneração do material, obstruindo os sítios de ligação do sorvente levando à falta de precisão e exatidão do método [29]. Deste modo, busca-se desenvolver novos materiais sorventes com a capacidade de reter seletivamente o analito e excluir as macromoléculas da amostra em uma única etapa. Os Polímeros Ionicamente Impressos (IIP) ou Molecularmente Impressos (MIP) tem ganhado grande atenção nos últimos anos devido à seletividade que apresentam [30-32]. Estes são materiais

poliméricos sintéticos com sítios de reconhecimento seletivo para o analito [33,34]. Os polímeros impressos são obtidos pela interação do íon ou molécula molde (template) com o monômero funcional. Posteriormente realiza-se a adição do agente de ligação cruzada, que possui a função de atribuir rigidez à matriz polimérica (reticulação das cadeias). Ao término da polimerização o template é retirado, obtendo cavidades seletivas em forma e tamanho para o template [35,36]. A natureza da seletividade depende da carga e raio iônico do metal, da sua afinidade com os grupos funcionais do monômero, além do número e tipo de geometria de coordenação entre monômero e metal [37,38].

Embora os polímeros impressos sejam seletivos, compostos orgânicos podem ser adsorvidos sobre a superfície do polímero, interferindo nas propriedades de reconhecimento e, como consequência, diminuindo sua seletividade [29]. Uma estratégia interessante para utilizar os polímeros impressos baseia-se na modificação química da superfície com comonômeros hidrofílicos, obtendo em um único material seletividade e eficiência na exclusão de macromoléculas, originando os polímeros quimicamente impressos com acesso restrito [39], denominados de IIP-RAM ou MIP-RAM. Para obtenção destes materiais, geralmente empregam-se comonômeros hidrofílicos, assim como o glicidilmetacrilato (GMA), hidroxietilmetacrilato (HEMA), glicerolmonometacrilato (GMAA) e gliceroldimetacrilato (GDMA) ou ainda por meio do revestimento protetivo da superfície do polímero com a albumina de soro bovino (BSA) [40,41]. A Figura 1 apresenta os comonômeros hidrofílicos comumente utilizados na modificação química.

Figura 1. Estrutura química dos comonômeros hidrofílicos utilizados como modificadores para a obtenção de materiais com acesso restrito.



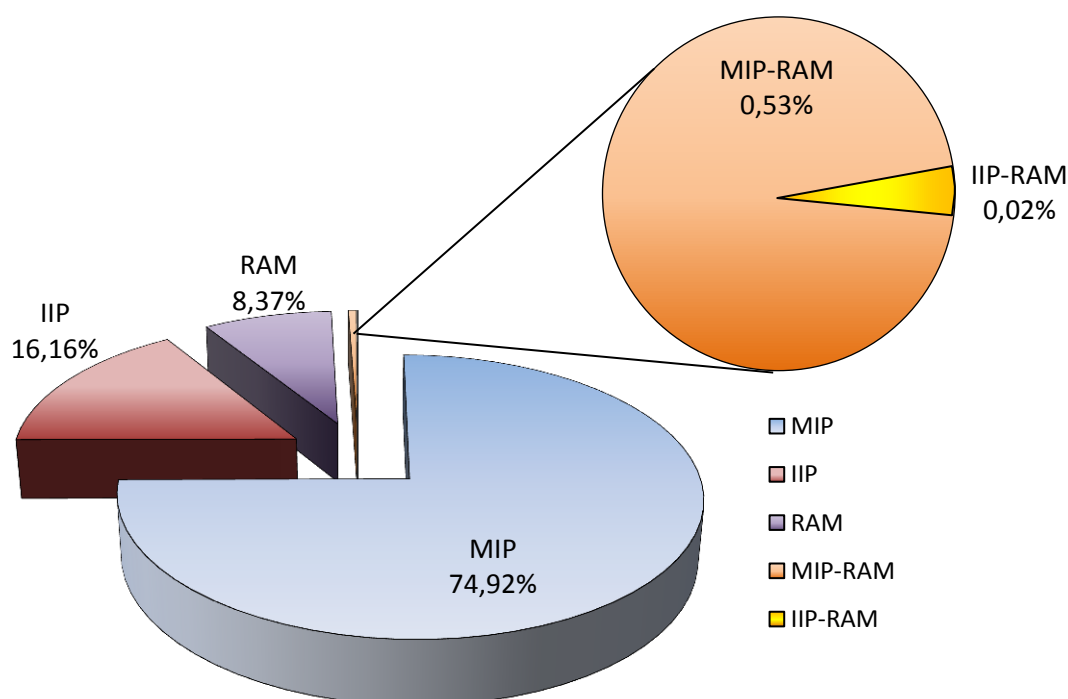
Os sorventes baseados em materiais de acesso restrito permitem a injeção direta e repetitiva de amostras biológicas e ambientais na coluna sem o tratamento prévio [42]. A capacidade de excluir macromoléculas pode ser resultado de processos ocasionados por barreira de difusão física (baseada no tamanho do poro), barreira de difusão química e em outras situações ambos os impedimentos podem ocorrer [43,44]. A exclusão por meio de barreira química tem sido a estratégia mais utilizada. Neste caso, a inserção do comonômero contendo grupos hidrofílicos e/ou ancoramento da BSA reduz significativamente a retenção das macromoléculas presentes na matriz amostral. Assim, quando o pH do meio é maior que o ponto de carga zero da superfície do material e da substância orgânica, ambos se encontram carregados negativamente causando a repulsão eletrostática, responsável pela

exclusão das macromoléculas e a retenção preferencial do analito nos sítios de seletividade [45-48].

Embora eficientes na remoção das macromoléculas da amostra, os materiais com acesso restrito são caracterizados por apresentarem seletividade limitada [49]. Portanto, a combinação das propriedades seletivas dos polímeros IIP e MIP e de acesso restrito dos materiais RAM em um único polímero têm sido considerada uma excelente abordagem para obter sorventes capazes de reter seletivamente o analito e evitar, simultaneamente a adsorção das macromoléculas em um único material [50-53].

Apesar das vantagens acerca dos polímeros impressos com acesso restrito, são ainda pouco relatados na literatura, indicando que o estado de arte ainda é incipiente. Apesar da vantagem que a estratégia oferece, dados da literatura apontam majoritariamente, que materiais de acesso restrito têm sido amplamente empregados aos polímeros molecularmente impressos (MIP-RAM) e acoplados a sistemas cromatográficos [47,48] com ênfase no *clean-up* de amostras de interesse clínico e ambiental sem a necessidade do tratamento prévio da amostra [54,55]. A Figura 2 mostra a diferença significativa no emprego dos polímeros MIP-RAM e principalmente IIP-RAM como adsorventes de SPE em estudos de extração/préconcentração do analito e exclusão de macromoléculas.

Figura 2. Porcentagem de trabalhos publicados de polímeros RAMs (1987-2018), MIP (1989-2018), IIP (1991-2018), MIP-RAM (1999-2018) e IIP-RAM (2013-2018).



Palavras chave: "Ion Imprinted Polymer", "Molecularly Imprinted Polymer", "Restricted Access Material", "Restricted Access Material and Molecularly Imprinted Polymer" e "Restricted Access Material and Molecularly Imprinted Polymer" (pesquisa refinada).

De acordo com a base de dados do *Web of Science*, 69 manuscritos são relacionados aos polímeros de impressão com acesso restrito. Destes, apenas três estão diretamente relacionados com IIP-RAM, sendo que, dois destes trabalhos, foram recentemente publicados por nosso grupo de pesquisa [51,56,57]

O primeiro a propor um material MIP-RAM que associa as características de impressão e acesso restrito em um único material foi Haginaka e colaboradores (1999). A impressão dos polímeros, criada para (S)-naproxeno foi obtida utilizando o 4-vinilpiridina como monômero funcional. A adição de uma mistura de comonômeros hidrofílicos, glicerolmonometacrilato (GMAA) e gliceroldimetacrilato (GDMA) foram utilizados para a formação da camada hidrofílica em torno do MIP. O polímero modificado foi capaz excluir a BSA sem alterar a seletividade do MIP [45].

Conseqüentemente, o desenvolvimento de novos materiais MIP-RAM tem ganhado destaque pela injeção direta de amostras complexas sem qualquer tratamento prévio para eliminar as macromoléculas da matriz. Para evitar o pré-tratamento *off-line* e a precipitação de proteínas na coluna cromatográfica, Xu et al. (2010) desenvolveu um polímero MIP-RAM como pré-coluna (*Switching Column*) para a determinação de sulfonamidas em amostras de leite. Por um processo conhecido como *iniferter* (*initiator-transfer-agentterminator*), ácido metacrílico (MAA) e glicidimetacrilato (GMA) foram enxertados sucessivamente na superfície da sílica para formar a cavidade de impressão e o acesso restrito na superfície do polímero, respectivamente. As propriedades restritivas foram obtidas com a abertura do anel epóxi do GMA [54].

A capacidade de revestir a superfície de polímeros seletivos com material hidrofílico e evitar a adsorção de proteínas criando uma barreira química levou ao desenvolvimento de revestimentos protetivos. O ancoramento de proteínas ao redor do polímero tem sido aplicado com sucesso em materiais de acesso restrito com grande capacidade de exclusão de macromoléculas, principalmente pelo revestimento da albumina do soro bovino (BSA) para a separação de material proteico de amostras de plasma humano com o objetivo de diminuir o consumo e a manipulação da amostra, além do tempo de análise por meio da injeção direta da amostra [53,58].

Moraes e colaboradores (2013) realizaram a síntese de um polímero MIP-RAM-BSA para clorpromazina visando o *clean up online* de macromoléculas em amostras de plasma humano. Segundo os autores, quando o glicerol dimetacrilato (GDMA) e hidroxietilmetacrilato (HEMA) foram utilizados como comonômeros hidrofílicos, apenas 84,0% das proteínas foram excluídas da amostra, enquanto que

o revestimento da albumina do soro bovino (BSA) possibilitou a exclusão de 99,7% das proteínas [59]. Em outros estudos, MIP foram revestidos com BSA demonstrando excelente desempenho na extração de ivermectina, antidepressivos tricíclicos e serotonina em amostras de carne e plasma humano, respectivamente, com exclusão simultânea das macromoléculas [49,60-61].

No que concerne os estudos dedicados à síntese de IIP-RAM, dados da literatura são muito escassos. Dos poucos estudos publicados, tem-se o relatado por Cui e colaboradores [51], do qual as cavidades de impressão do polímero IIP-RAM sintetizado foi baseado em uma rede de poli(MAA) para extração seletiva de Cu^{2+} e exclusão de macromoléculas em amostras de urina e soro humano. Neste estudo, não foram utilizados comonômeros hidrofílicos e/ou BSA, para confirmar a natureza do material de acesso restrito. Mais recentemente, nanotubos de carbono (CNT) revestidos com a BSA têm sido propostos como materiais eficientes para a exclusão de macromoléculas e sorção de cádmio e chumbo em amostras biológicas, resultando em um material com acesso restrito denominado RACNT-BSA. O revestimento da BSA foi realizado por interconexão dos grupos amino da proteína usando glutaraldeído como agente de ligação cruzada. Segundo os autores, apesar de carregada negativamente, a densidade de carga da BSA não é suficientemente densa para causar a retenção dos íons Cd^{2+} e Pb^{2+} que podem penetrar através das cadeias peptídicas da cobertura ocorrendo um processo de adsorção pela incorporação preferencial dos íons no CNT e simultânea exclusão das proteínas. Nenhum estudo acerca do efeito do revestimento biocompatível da BSA sobre a sorção competitiva de Cd^{2+} e Pb^{2+} na presença de íons interferentes foi avaliada [62,63].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um estudo pioneiro dedicado à preparação de IIP-RAM para extração seletiva de Cu^{2+} e exclusão simultânea da BSA. Neste estudo, Suquila e colaboradores (2018) sintetizaram um sorvente de alitiourea (ATU) impresso para cobre na presença de HEMA e revestido com BSA para a exclusão de proteínas. O efeito dos solventes porogênicos (etanol e acetonitrila), além da modificação química do IIP com HEMA e/ou revestimento da BSA foram detalhadamente investigados sobre a capacidade de retenção do Cu^{2+} e exclusão de proteínas [56]. Portanto, de acordo com o exposto e tendo em vista os poucos trabalhos da literatura sobre o desempenho de materiais IIP-RAM para a pré-concentração de íons e exclusão de macromoléculas, o presente estudo trata, pela primeira vez, da investigação e modificação de polímeros com acesso restrito de poli(ATU) para a sorção seletiva de Cd^{2+} na presença de ácido húmico, como macromolécula. O papel do comonômero HEMA e do ancoramento da BSA nas propriedades seletivas de sorção do material foi avaliado em detalhes pela síntese dos polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Os polímeros foram sintetizados e caracterizados por análise de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Termogravimétrica (TGA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise elementar CHNS e análise textural, além de estudos de *Swelling Effect* e Molhabilidade. Os polímeros foram caracterizados e avaliados na presença da substância húmica para o desenvolvimento de um método *online* de pré-concentração de Cd^{2+} e *clean-up* de AH em diferentes amostras de água empregando um sistema (FIA-FAAS) constituído de um sistema de Injeção em Fluxo (FIA) acoplado à Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS). Íons Cd^{2+}

foram empregados como template para avaliar a capacidade de impressão do IIP-RAM devido à sua toxicidade e potencial de bioacumulação no organismo humano.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou HPLC. Nitrato de cádmio tetra hidratado ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureza 98-103%), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA, pureza 98%), 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN, pureza 98,0%), N-aliltiourea (ATU, 98%), ácido húmico (HA), albumina do soro bovino (BSA, 98%), glutaraldeído (25% (v/v) em água); borohidreto de sódio (NaBH_4 , 98%), biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, 99%), carbonato de sódio (Na_2CO_3 , 99,5%), brometo de potássio (KBr, 99%) e acetonitrila grau HPLC (ACN, 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Germany). O acetato de sódio (CH_3COONa , 99%), dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 98%), cloridrato de tris-(hidroximetil)aminometano ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$, 99%) e 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA, purity 98%) foram adquiridos da Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brazil), JTBaker[®] (Ecatepec, Mexico), Merck[®] (Darmstadt, Germany) e Acros Organics[®] (Morris Plains, NJ, USA), respectivamente. Soluções de Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} foram preparadas com apropriadas diluições a partir de soluções padrão de 1000,0 mg L⁻¹ da Quimilab (Jacareí, SP, Brazil). Todas as soluções padrão foram preparadas com apropriada diluição da solução estoque com água ultrapura (18.2 MΩ cm) obtida de um sistema de purificação ELGA[®] PURELAB (Woodridge, IL, USA). Soluções tampão $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH 5,70), fosfato (pH 6,70) e tris-HCl (pH 8,70 e 9,70) em diferentes concentrações foram utilizadas durante todos os experimentos.

2.2. Síntese dos polímeros

2.2.1. Síntese dos polímeros IIP e IIP-HEMA

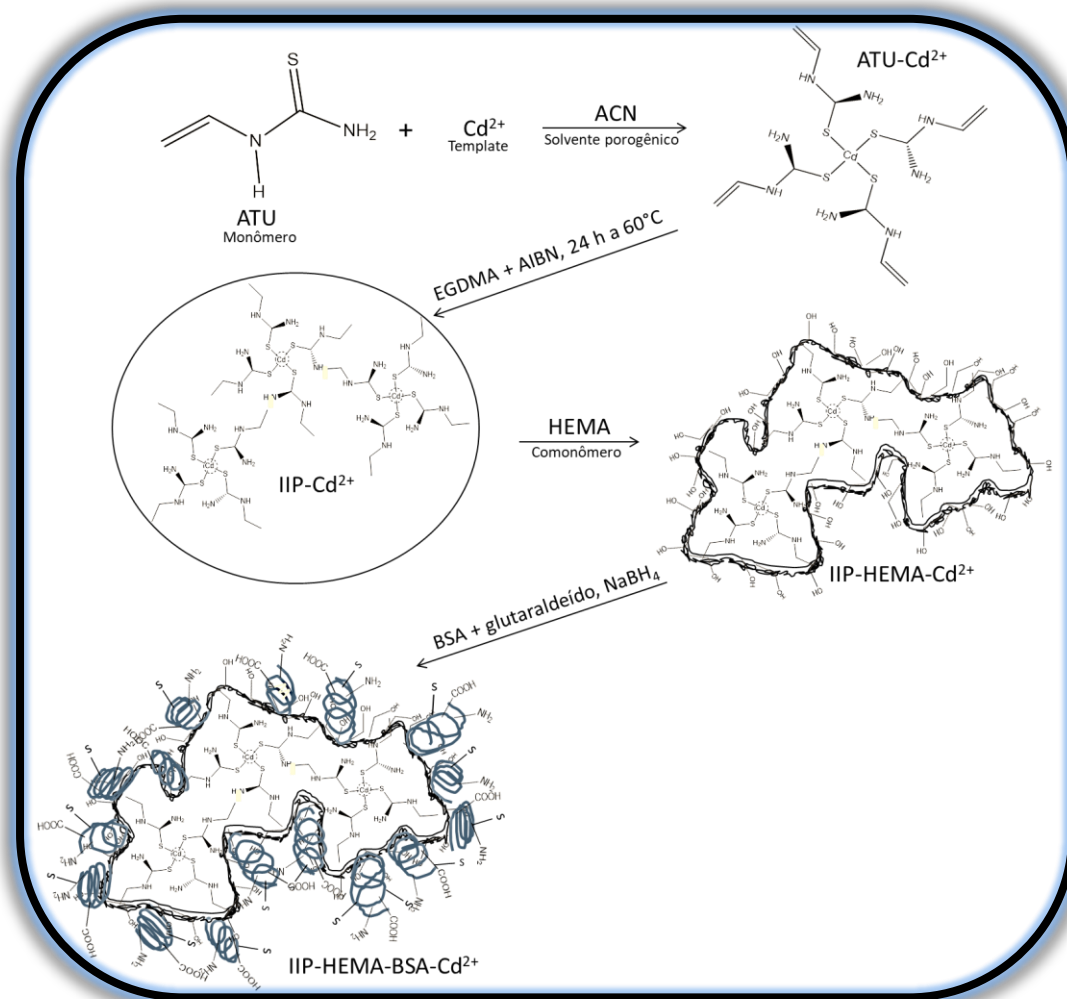
Para a síntese do IIP, 0,5 mmol (154,2 mg) de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (template) e 2,5 mmol (296,4 mg) de ATU (monômero) foram dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila (solvente porogênico). Na sequência, 30,0 mmol (5,8 mL) do agente de ligação de cruzada EGDMA e 0,6 mmol (102,0 mg) do iniciador radicalar AIBN foram adicionados à solução. A solução foi purgada com nitrogênio por 5,0 min e o frasco reacional foi selado e mantido em banho de óleo a 60°C por 24 horas. A síntese do IIP-HEMA foi realizada de maneira similar ao polímero IIP, porém com a adição de 5,0 mmol (600,0 μL) do co-monômero HEMA. Os polímeros sem impressão química (controle), NIP e NIP-HEMA também foram sintetizados e obtidos de maneira similar sob as mesmas condições na ausência do íon template. Após a síntese, os polímeros obtidos foram lavados com água ultrapura para a remoção do excesso de solvente, seco, triturado e peneirado para obter um tamanho de partículas entre 106-150 μm . Para a remoção dos íons Cd^{2+} da rede polimérica, os materiais foram sucessivamente lavados com HCl 2,0 mol L^{-1} e o efluente monitorado por espectrofotometria de absorção atômica em chama. Após a remoção do template os materiais foram lavados com água ultrapura para a remoção do excesso de HCl da superfície dos polímeros.

2.2.2. Ancoramento da BSA na superfície do polímero IIP-HEMA

Baseado em trabalhos anteriores [59], o ancoramento da BSA foi realizado empacotando 500,0 mg do polímero hidrofílico IIP-HEMA (partícula entre 106-150 μm) em uma minicoluna e acoplada em modo *in-line* a um sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Inicialmente, foram percolados pela minicoluna 20,0 mL de

uma solução de BSA 1,0 % (m/v) preparado em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 6,00 e 5,0 mL de glutaraldeído 25% (v/v). Após 5h de contato com a solução de glutaraldeído, 10,0 mL de borohidreto de sódio a 1,0% (m/v) foram percolados pelo polímero e a minicoluna foi mantida em contato com a solução por 2 horas. O polímero obtido com revestimento proteico IIP-HEMA-BSA foi então lavado sucessivamente com água ultrapura por 30 min e o polímero mantido sob refrigeração a 4°C. Todas as soluções, BSA, glutaraldeído e NaBH₄ foram percolados através da minicoluna acoplada ao sistema FIA a uma vazão 1,0 mL min⁻¹. A Figura 3 apresenta o esquema da síntese dos materiais IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA.

Figura 3. Representação esquemática da síntese dos polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA.



2.3. Instrumentação e Caracterização dos Polímeros

2.3.1. Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho dos polímeros foram registrados utilizando a Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) modelo Shimadzu® 8300 Fourier (Kyoto, Japão) operando em modo de transmissão na faixa de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (empregando pastilhas de KBr). Para a obtenção das pastilhas, brometo de potássio (KBr) foi previamente seco em mufla a aproximadamente 600°C durante 24 horas, sendo posteriormente homogeneizado com auxílio de almofariz e pistilo. Com o auxílio de um molde evacuável para pastilhamento (Evacuable KBr & Briquetting Pellet Dies), a mistura obtida foi prensada manualmente e compactada uniaxialmente na forma de pastilhas (discos) com diâmetro de 13 mm e imediatamente analisadas.

2.3.2. Análise textural (Área superficial, Tamanho e Volume de poros)

A área superficial específica, os tamanhos médios e volumes de poros dos polímeros foram realizados por meio da sorção de nitrogênio utilizando o equipamento Quantachrome® Nova 1200e (Boynton Beach, Flórida, EUA). Para a realização desta análise os polímeros foram secos a 120°C por 4 horas sob vácuo para remoção de água fisicamente adsorvida nos materiais. Aos dados obtidos foram aplicados o modelo matemático de BET (Brunauer-Emmett-Teller) para determinação da área superficial, enquanto que o tamanho médio dos poros e o volume de poros dos polímeros foram estimados por meio do modelo de BJH (Barrett-Joyner-Halenda).

2.3.3. Morfologia e Composição Elementar (MEV e EDS)

A morfologia dos polímeros e a presença de Cd^{2+} e S nas cavidades seletivas criadas na estrutura da rede polimérica foram verificadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) combinada com a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), respectivamente, utilizando o equipamento da Quanta-200 (Philips-FEI, Amsterdam, Holanda). Para a obtenção das imagens de MEV, os polímeros foram revestidos com uma fina camada de ouro (30 nm) por pulverização utilizando um equipamento Bal-Tec SCD Sputter Coater (New York, EUA). As micrografias dos polímeros foram obtidas com escala de ampliação de 70 e 30000 vezes. Para verificar qualitativamente o teor aproximado de oxigênio, enxofre e cádmio por EDS os materiais foram previamente revestidos com carbono com o apoio de um sistema de aspersão Leica[®] SCD (Wetzlar, Alemanha). A distribuição elementar e os mapeamentos dos átomos obtidos para o espectro de energia vs contagem relativa de raio-X foram realizadas com escala de 2,0 μm .

2.3.4. Análise Elementar CHNS

A quantificação dos teores de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre nos materiais, assim como a porcentagem de conversão de monômero, comonômero e agente reticulante obtida após a síntese dos polímeros foram determinados usando um analisador elementar PerkinElmer[®] 2400 series-II CHNS analyzer (Waltham, MA, EUA) utilizando L-cistina como padrão. A combustão de 2,0 mg de cada polímero realizada em atmosfera de oxigênio puro e os gases resultantes quantificados utilizando um detector de condutividade térmica (TCD).

2.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico dos polímeros foi investigado por Análise Termogravimétrica (TGA) usando um equipamento Perkin Elmer® TGA 4000 (Waltham, MA, EUA). Para a análise, aproximadamente 15,0 mg de polímero foram aquecidos na faixa de temperatura de 30,0 a 900,0°C a uma taxa de aquecimento de 10,0 °C min⁻¹ sob um fluxo de nitrogênio constante de 20,0 mL min⁻¹.

2.4. Avaliação do Efeito da Hidrofilicidade dos Polímeros

2.4.1. Ensaio de Molhabilidade

O grau de molhabilidade dos polímeros foi realizado por meio do contato de água ultrapura na superfície dos polímeros utilizando o método da gota séssil. Para isso, 30,0 mg de cada polímero foram uniaxialmente compactados em forma de disco circular com um diâmetro de 13,0 mm. Em seguida, a gota de água (aproximadamente 1,3 µL) foi colocada cuidadosamente sobre as superfícies de cada polímero com o auxílio de uma micro-seringa. As imagens foram capturadas no plano transversal com uma câmera comum de 13 megapixels, colocada sobre um suporte de metal. As imagens capturadas foram tiradas imediatamente após o contato da gota com a superfície do polímero em diferentes intervalos de tempo.

2.4.2. Swelling Effect (SE)

A fim de comparar a hidrofilicidade dos materiais IIP, IIP-HEMA, IIP-HEMA-BSA, 100,0 mg de cada polímero (massa seca) foram mecanicamente agitados com 10,0 mL de água ultrapura (pH 6,80) por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os materiais foram filtrados em membrana de 0,45 µm (Nylon®) sob vácuo e pesados (massa úmida). A razão entre as massas iniciais e finais de cada

polímero foram utilizados para calcular o efeito de inchaço, conforme apresentado na Equação (1) [64]:

$$SE = \frac{Massa_{úmida} - Massa_{seca}}{Massa_{seca}} \times 100\% \quad (1)$$

2.5. Ponto de carga zero (p_{cz})

O ponto de carga zero (p_{cz}) dos polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA foi determinado por titulação potenciométrica. A titulação foi realizada em um frasco de erlenmeyer contendo 15,0 mg de cada polímero em 20,0 mL de NaOH 0,01 mol L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 11 com NaOH 0,1 mol L⁻¹ antes da titulação. Utilizando uma bureta de 50,0 mL cada polímero foi titulado com solução de HCl 0,01 mol L⁻¹ na presença de fenolftaleína como indicador. As soluções de HCl e NaOH, foram padronizadas com carbonato de sódio (Na₂CO₃) e biftalato de potássio (C₈H₅KO₄), como padrão primário, respectivamente.

2.6. Estudos de Seletividade

O efeito de impressão criado durante a síntese dos polímeros foi investigado com estudos de sorção competitiva utilizando soluções binárias contendo íons Cd²⁺ e íons concomitantes. Os experimentos foram realizados em batelada agitando 50,0 mg de cada polímero (IIP, IIP-HEMA, IIP-HEMA-BSA, NIP, NIP-HEMA e NIP-HEMA-BSA) em 50,0 mL de uma solução binária (1:1) contendo 1,0 mg L⁻¹ de Cd²⁺/Ni²⁺, Cd²⁺/Zn²⁺, Cd²⁺/Cu²⁺, Cd²⁺/Co²⁺ e 5,0 mg L⁻¹ de Cd²⁺/Pb²⁺ sob as condições otimizadas do método (tampão tris-HCl pH 8,70). Após 25 min de agitação, a solução binária foi centrifugada e o sobrenadante analisado por FAAS. O coeficiente de distribuição (K_d) de cada íon obtido para os polímeros impressos e não impressos

foram determinados de acordo com a Equação (2), utilizando a concentração inicial e final (C_i e C_f), o volume da solução (V) e a massa de sorvente (M).

$$K_d = \frac{C_i - C_f}{C_f} \times \frac{V \text{ (mL)}}{M \text{ (g)}} \quad (2)$$

A partir dos valores de K_d para cada polímero na presença do íon concomitante (M^{2+}), os coeficientes de seletividade (k) e de seletividade relativo (k') foram calculados de acordo com as Equações (3) e (4). Os valores do k' foram obtidos pela comparação entre IIP/NIP, IIP-HEMA/NIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA/NIP-HEMA-BSA [65].

$$k_{(Cd^{2+}/M^{2+})_{IIP_{Sou}NIP_S}} = \frac{K_d(Cd^{2+})}{K_d(M^{2+})} \quad (3)$$

$$k' = \frac{k_{(Cd^{2+}/M^{2+})_{IIP_S}}}{k_{(Cd^{2+}/M^{2+})_{NIP_S}}} \quad (4)$$

2.7. Sistema FIA-FAAS desenvolvido para a extração/pré-concentração *online* de Cd^{2+} com simultânea exclusão de AH

O sistema FIA-FAAS composto basicamente por uma bomba de propulsão de líquido, um sistema de injeção e um detector foi construído por um sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) combinado por um injetor comutador construído em acrílico, operando em duas etapas diretas (amostragem e injeção), além de uma bomba peristáltica GILSON[®] Minipuls Evolution (Middleton, Wi, EUA), equipada com tubos de Tygon[®] conectados a tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno

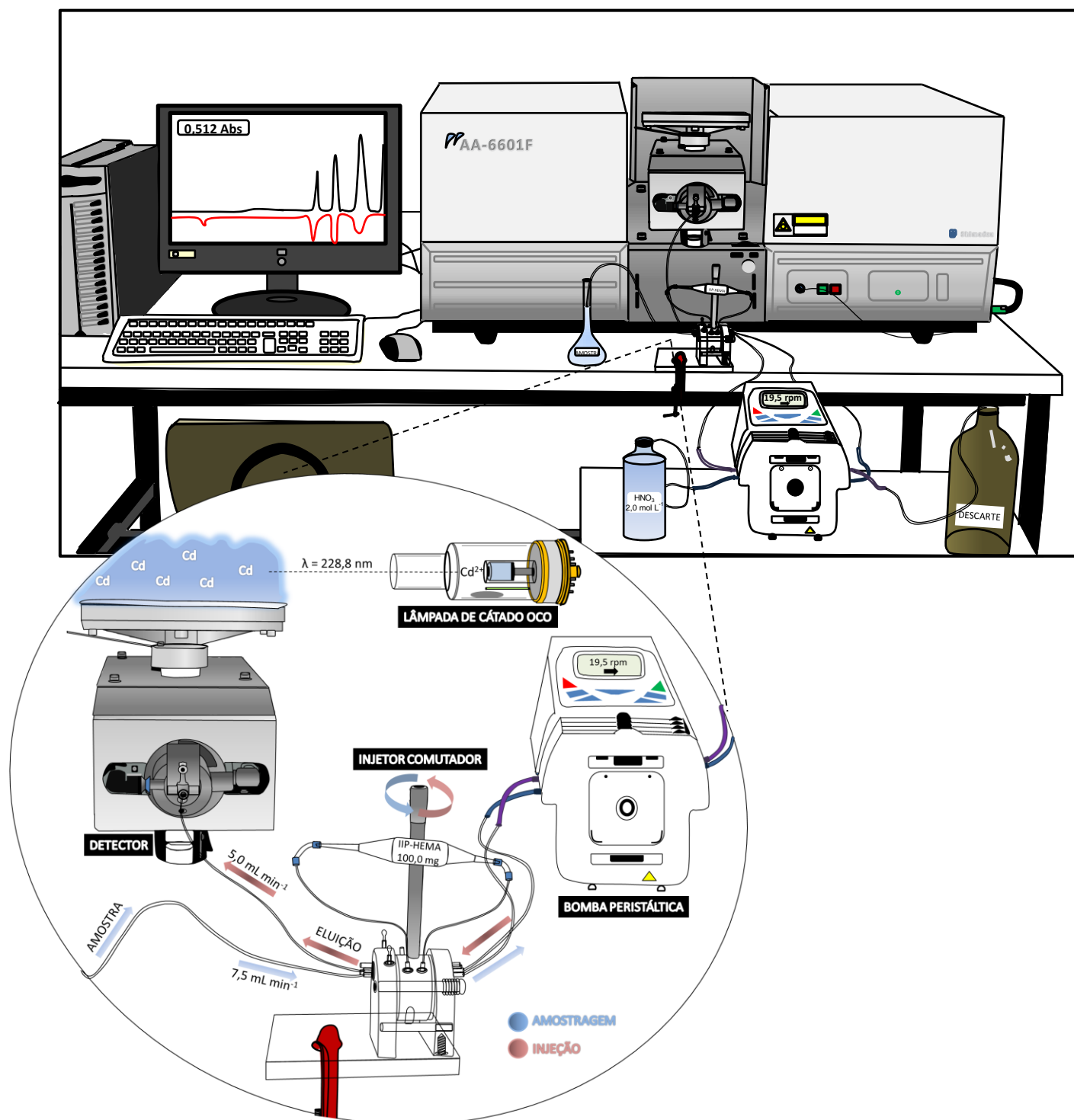
para realizar a propulsão das soluções. Uma minicoluna (2,2 cm x 0,9 cm) recheada com o material polimérico foi diretamente posicionada no lugar da alça de amostragem do injetor comutador.

O sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) foi acoplado a um Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (FAAS) Shimadzu® AA-7000 (Tóquio, Japão) equipado com lâmpada de catodo oco de cádmio (Hamamatsu Photonics, K.K) com fonte de radiação de 13,0 mA operando no comprimento de onda de 228,8 nm e com largura de banda espectral de 0,5 nm para a determinação *online* do Cd²⁺. Para a correção de fundo (*background*) o FAAS foi equipado com uma lâmpada de deutério. A chama foi composta por uma mistura de acetileno e ar comprimido com uma vazão constante de 2,0 e 15,0 L min⁻¹, respectivamente.

Nesse sistema, todas as amostras e padrões foram submetidos exatamente ao mesmo tempo de pré-concentração e a um rigoroso controle da geometria de fluxo e extensão do percurso analítico (ponto de injeção até o detector), e, portanto, a etapa de amostragem foi realizada sem a necessidade de alcançar o equilíbrio de sorção Cd²⁺-superfície, diminuindo assim, o tempo de análise. A etapa subsequente, de eluição do analito, foi avaliada de modo a maximizar a eficiência de remoção do analito da superfície dos polímeros. Dessa forma, os parâmetros críticos de pré-concentração e eluição foram investigados para obter as melhores condições para a determinação *online* de Cd²⁺ e exclusão de AH utilizando o sistema FIA-FAAS.

O sistema FIA-FAAS operando em linha única, do inglês *Single-line mode*, foi configurado em duas etapas: uma denominada de etapa de amostragem (sorção do Cd²⁺) e outra, realizada pela comutação do injetor, conhecida como etapa de injeção da amostra (eluição). A Figura 4 ilustra o sistema FIA-FAAS desenvolvido.

Figura 4. Representação ilustrativa do sistema FIA-FAAS desenvolvido para a pré-concentração de Cd^{2+} e simultânea exclusão de AH.



O procedimento inicia com a percolação de 20,0 mL de padrão ou amostra tamponada em Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹ (pH 8,7) através da minicoluna contendo 100,0 mg do polímero a uma vazão de 7,5 mL min⁻¹. Então, o injetor é comutado e posicionado à etapa de injeção da amostra, onde o analito retido sobre a superfície é eluído por meio de solução HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ a uma vazão constante de 5,0 mL min⁻¹. O analito retido é transportado através do percurso analítico em direção ao sistema de nebulização onde é direcionada à chama e monitorado em 228,8 nm. A etapa de eluição foi posicionada em sentido contrário à etapa de amostragem para impedir a formação de caminhos preferências no interior da minicoluna. A intensidade do sinal analítico medido (altura de pico) foi obtida considerando a média de três medidas (n=3). Para aumentar a frequência analítica e a eficiência de concentração do método, padrões e amostras foram previamente tamponados evitando o recondicionamento da minicoluna no fim de cada ciclo (etapa de amostragem e eluição).

Para avaliar a quantidade de AH excluída pelos polímeros, o efluente das minicolunas foram coletados e analisados por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis (190-400 nm). Os espectros obtidos, antes e após a etapa de pré-concentração de Cd²⁺, foram avaliados sob toda a faixa de pH. utilizando um espectrofotômetro Shimadzu[®] Mini 1240 (Kyoto, Japão). As medidas de pH de amostras e padrões analisados foram realizadas com o apoio de um pHmetro digital da pH Metrohm[®] 826 (Herisau, Suíça).

3. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

3.1. Estratégias de Otimização: Planejamento Fatorial

A etapa de otimização foi realizada por meio de um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} utilizando um delineamento experimental, de resolução do tipo V, na qual os efeitos principais se confundem com as interações entre quatro fatores e as interações de dois fatores com os efeitos de três fatores [66]. Todos os experimentos foram obtidos em duplicata, totalizando 32 ensaios realizados em ordem aleatória para dois níveis, superior (+) e inferior (-). As variáveis independentes avaliadas foram: tipo de eluente (EL), concentração do eluente (CE), massa de adsorvente (MA), vazão de pré-concentração (VP) e concentração do tampão (CT). Durante todo o processo de otimização foram percolados pela coluna 20,0 mL de uma solução de Cd^{2+} $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ previamente tamponadas (0,1 ou $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCl pH 8,70.

O planejamento fatorial fracionário foi avaliado por comparação de duas respostas dependentes: absorvância e eficiência de sensibilidade. Os experimentos foram realizados em duplicata e a concentração de cádmio mantida em $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ durante todo o planejamento. A influência dos efeitos no desempenho do método proposto foi analisada pela ANOVA e os níveis de cada fator estabelecido pelo p-valor, e analisado por meio do gráfico de Pareto e de Probabilidade com intervalo de confiança ao nível de 95%. A escolha do deslocamento das variáveis também foi estimada considerando a melhor condição para o sistema FIA-FAAS construído.

Os dados experimentais foram processados usando o programa *StatSoft Statistica*® 7.0 software package (Tulsa, OK, USA) [67]. A significância dos efeitos foi checada pela Análise de Variância (ANOVA) e a escolha dos níveis de cada variável utilizando o valor-p.

3.2. Eficiência de Sensibilidade (ES)

O parâmetro Eficiência de Sensibilidade (ES) tem sido proposto por alguns pesquisadores para a otimização das condições em sistemas de pré-concentração *online* [68,69]. É definido pela razão entre o sinal analítico obtido para o sistema e o tempo necessário para realizar as etapas pré-concentração e eluição do analito. Pode ser usado para demonstrar que a eficiência do sistema aumenta com o aumento da taxa de vazão de pré-concentração da amostra. Assim, o equilíbrio entre a intensidade de sinal e tempo de pré-concentração é levado em consideração e a frequência analítica do método passa a ser um parâmetro fundamental na escolha da melhor condição do método. Considerando que $t_{min} = \frac{V_{amostra} (mL)}{VP (mL s^{-1})}$

a Equação 5 demonstra a relação entre a ES e a vazão de pré-concentração.

$$ES = \frac{Abs \times VP}{V_{amostra}} \quad (5)$$

Nesta equação, Abs é a intensidade do sinal analítico, VP refere-se à vazão de pré-concentração ($mL \text{ min}^{-1}$), V ao volume de amostra percolado (20,0 mL) e t ao tempo de pré-concentração (min).

3.3. Parâmetros Analíticos

Sob as condições otimizadas, as figuras de mérito foram determinadas de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [70]. O coeficiente de correlação (r) das curvas analíticas, que é uma medida do grau de associação entre a concentração de Cd^{2+} e o sinal analítico (absorbância) foi obtida

pela razão entre a raiz quadrada das somas quadráticas explicadas pelo modelo (SQ_R) e total (SQ_T), de acordo com a Equação 6.

$$R = \sqrt{\frac{SQ_R}{SQ_T}} \quad (6)$$

Para testar a relação (linearidade) entre as variáveis absorvância e concentração de cádmio, a Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada à equação de regressão linear do modelo ($y = b_1x + b_0$) e o valor experimental de F_{cal} foi calculado pela razão residual entre a falta de ajuste e erro puro e comparado com o valor de F_{tab} crítico ao nível de 95%. O coeficiente F_{cal} calculado é dado pela Equação 7.

$$F_{cal} = \left(\frac{SQ_{faj}/m - p}{SQ_{ep}/n - m} \right) = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad (7)$$

Assumindo, que o valor $F_{cal} > F_{tab}$ rejeita-se a hipótese nula H_0 , há evidência de falta de ajuste para o modelo linear no nível $\alpha = 0,05$ para $F_{tab} (\alpha, m - p, n - m)$, sendo m , n e p o número de experimentos independentes, total e de coeficientes do modelo, respectivamente.

Para avaliar a sensibilidade do método analítico, o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados para verificar o nível de concentração de Cd^{2+} que o método consegue diferenciar do ruído do equipamento, de acordo com as seguintes equações 8 e 9:

$$LOD = \frac{3 \times DP}{a} \quad (8)$$

$$LOQ = \frac{10 \times DP}{a} \quad (9)$$

Nestas equações, DP representa o desvio padrão do sinal de branco (n = 10) e *a* a inclinação da curva analítica. Os parâmetros analíticos como fator de pré-concentração (*FP*), índice de consumo (*IC*) e eficiência de concentração (*EC*) foram obtidos para o método proposto. O *FP* definido como a razão entre as inclinações das curvas analíticas com e sem pré-concentração foi obtido de acordo com a seguinte Equação 10:

$$FP = \frac{a_{\text{pré-concentrando}}}{a_{\text{sem pré-concentração}}} \quad (10)$$

O *IC* foi obtido por meio da razão entre o V_{amostra} (mL) e o *FP*, enquanto que a *EC* do método é definida como à razão entre o *FP* e o tempo de pré-concentração (*t*) em minutos, Equações 11 e 12, respectivamente, ambas determinadas de acordo com a literatura [71].

$$IC = \frac{V_{\text{amostra}}}{FP} \quad (11)$$

$$EC = \frac{FP}{t} \quad (12)$$

Adicionalmente, a precisão intra-dia (n=10) e inter-dia (n=2) do método foi avaliada em termos de repetibilidade em dois níveis de concentração (2,5 µg L⁻¹ e

40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), na ausência e presença do AH. Os desvios padrões relativos (DPR, %) foram calculados entre as réplicas, considerando o limite de tolerância de $\pm 5,0\%$.

3.4. Efeito de Íons Interferentes

Sob as condições otimizadas, o efeito de íons comumente existentes em amostras de águas foi avaliado sobre a taxa de pré-concentração de Cd^{2+} na ausência e presença de matéria orgânica dissolvida. Para isso, diferentes concentrações dos cátions Fe^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{3+} , V^{5+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} e dos ânions CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , Br^- e F^- foram adicionados na presença de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} . O limite de tolerância foi definido como a concentração de íons interferentes que causam um erro relativo menor que $\pm 10,0\%$ de recuperação.

3.5. Preparo de amostra

3.5.1. Amostras de Água

Amostras de água do lago Igapó foram coletadas em frascos de polietileno próximas à Universidade Estadual de Londrina (UEL), além de amostras de água de rio em diferentes localidades da cidade de Arapongas, e do município de Querência do Norte (extremo noroeste) e Palotina (extremo oeste). Amostras de poço artesiano também foram obtidas em Palotina. Amostras do Parque do Buracão, na cidade de Assis (São Paulo, Brasil) também foram coletadas e analisadas similarmente.

As amostras coletadas foram acidificadas com HNO_3 65,0% (m/m) até pH 2,0 (14 gotas por litro de amostra), filtradas a vácuo usando filtros de membrana de Nylon[®] 0,45 μm (GVS Filter Technology, Morecambe, UK) para remoção de partículas suspensas e armazenadas em refrigerador a 5,0 °C. Para realizar a determinação de Cd^{2+} , o pH das amostras foi ajustado para 8,70 com solução

tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹ e imediatamente analisados pelo método proposto utilizando o sistema FIA-FAAS. Amostras de água mineral obtidas em supermercados locais também foram analisadas de maneira similar, exceção feita à etapa de acidificação e filtração. A exatidão do método foi confirmada na ausência e presença de AH 5,0 mg L⁻¹ por meio de testes de adição e recuperação em dois níveis de concentração de Cd²⁺ (2,0 µg L⁻¹ e 20,0 µg L⁻¹). Todas as determinações foram realizadas em triplicata (n = 3).

3.5.2. Amostra de Cigarro, Linhaça e Fitoterápico

O método proposto foi aplicado em amostras de fitoterápico (*Ginkgo biloba*), e cigarro, além de diferentes amostras de linhaça. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados locais na cidade de Londrina (Paraná, Brasil). As amostras foram secas em estufa a 60,0 °C durante 24 h e em seguida, 500,0 mg de cigarro, 600,0 mg de linhaça e 200,0 mg de *Ginkgo biloba* foram pesados separadamente em frasco de Teflon[®] e mantido *overnight* com uma mistura de 10,0:4,0, 10,0:2,0 e 10,0:4,0 (v/v), respectivamente, de HNO₃ 65,0 % (m/m) e H₂O₂ 30,0% (v/v). A mistura foi submetida à digestão ácida assistida por microondas utilizando um sistema de digestão de alta performance *Ethos one* (Milestone, Itália). Para a digestão das amostras de *Ginkgo biloba* e cigarro foram utilizados 5 etapas de gradiente de temperatura, enquanto que para a digestão da linhaça foram usadas 4 etapas. A Tabela 1 descreve o procedimento utilizado na digestão ácida das amostras por micro-ondas.

Tabela 1. Gradiente de temperatura utilizado para o procedimento de digestão ácida por microondas das amostras de cigarro, *Ginkgo biloba* e linhaça.

| Amostra | Etapa | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Potência (W) |
|--------------------------------|-------|------------------|-------------|--------------|
| Cigarro e <i>Ginkgo Biloba</i> | 1 | 80,0 | 6,0 | 1200 |
| Linhaça | 1 | 120,0 | 5,0 | 750 |
| Cigarro e <i>Ginkgo Biloba</i> | 2 | 80,0 | 5,0 | 1200 |
| Linhaça | 2 | 120,0 | 2,0 | 750 |
| Cigarro e <i>Ginkgo Biloba</i> | 3 | 120,0 | 7,0 | 1200 |
| Linhaça | 3 | 200,0 | 10,0 | 750 |
| Cigarro e <i>Ginkgo Biloba</i> | 4 | 120,0 | 5,0 | 1200 |
| Linhaça | 4 | 190,0 | 15,0 | 750 |
| Cigarro e <i>Ginkgo Biloba</i> | 5 | 190,0 | 15,0 | 1200 |
| Linhaça | 5 | - | - | - |

Após a digestão, as amostras de *Ginkgo biloba*, cigarro e linhaça foram evaporadas até quase a secura com uma chapa de aquecimento, para eliminar o excesso de HNO₃ residual e imediatamente dissolvidas em água ultrapura e então, transferidas para balões volumétricos de 50,0, 25,0 e 50,0 mL, respectivamente. As amostras digeridas foram tamponados com Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹ pH 8,7 e imediatamente analisadas.

3.5.3. Material Certificado de Referência (CRM TORT-2)

Material certificado de referência de hepatopâncreas de lagosta (CRM TORT-2, *National Research Council of Canada*) foi utilizado para verificar a exatidão do método proposto (com valor certificado de Cd²⁺ de 26,70 ± 0,60 mg kg⁻¹). Para a determinação de cádmio, 140,0 mg do material certificado de referência foram pesados em frascos de Teflon[®] (n = 3). Na sequência foram adicionados 10,0 mL de HNO₃ 65,0 % (m/m) e 2,0 mL de H₂O₂ 30,0 % (v/v). Após a decomposição da amostra, a solução resultante foi aquecida em chapa de aquecimento a uma temperatura de aproximadamente 100,0 °C até quase total secura da solução. O

resíduo foi dissolvido em água ultrapura e o pH do meio ajustado em tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹ (pH 8,70). O volume final foi aferido com água ultrapura em balões de 250,0 mL. A digestão assistida por micro-ondas do material de referência foi realizada seguindo o mesmo gradiente de temperatura para o processo de digestão das amostras de cigarro, conforme procedimento descrito na seção 3.5.2. Amostras de Cigarro, Linhaça e Fitoterápico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

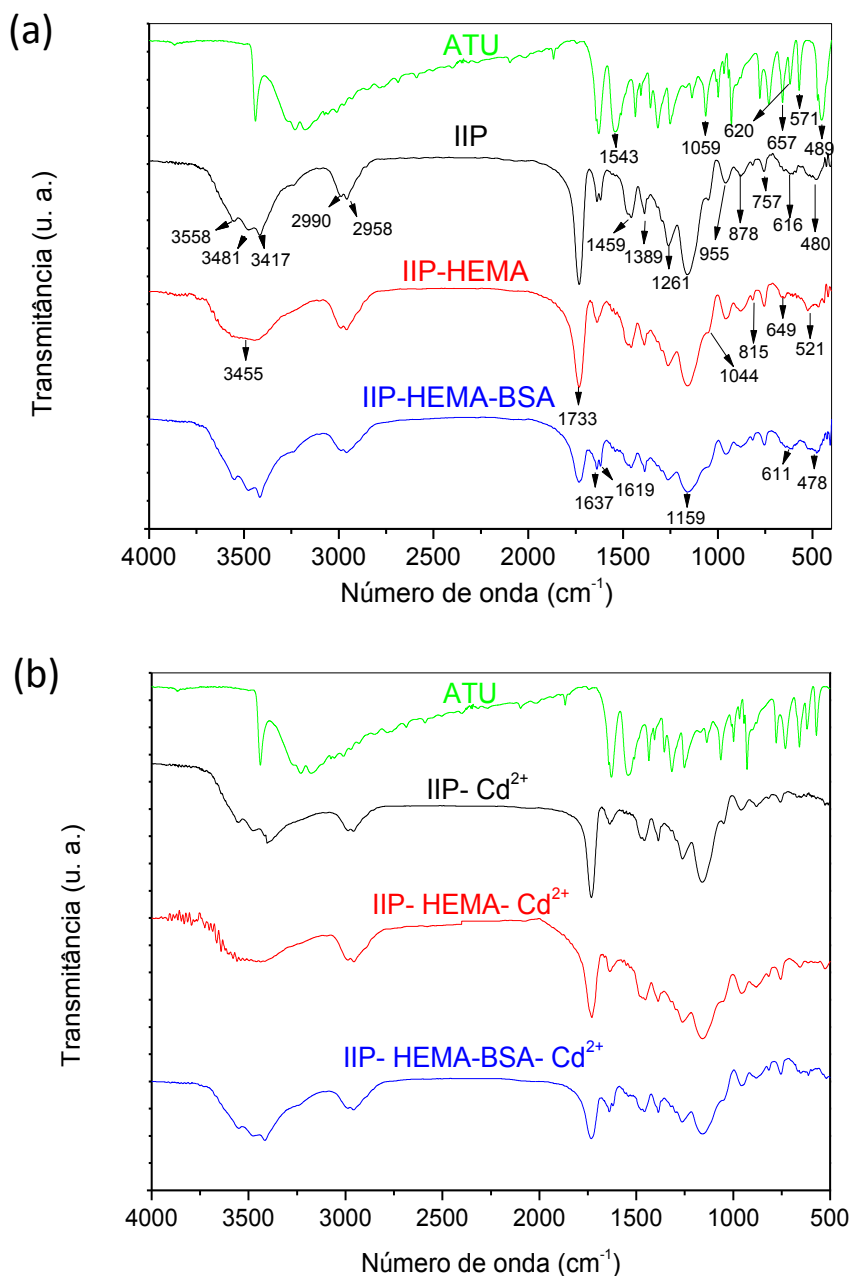
4.1. Caracterização dos materiais IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA

A análise termogravimétrica (TG) e a Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) dos polímeros foram obtidas antes e após a remoção do íon template, com exceção feita à microscopia eletrônica de varredura (MEV) que apresentaram imagens similares.

4.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

A Figura 5 apresenta os perfis espectrais obtidos por infravermelho (FT-IR) para o ligante bifuncional N-alil-tiourea e dos adsorventes IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA antes e após a remoção do íon template (Cd²⁺).

Figure 5. Espectros de FT-IR do ligante bifuncional ATU e dos adsorventes IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA na (a) ausência e (b) presença do íon template (Cd^{2+}).



As bandas observadas em 955 cm^{-1} são atribuídas à vibração de deformação angular (*bending*) entre as ligações de (CH_2) e ($=\text{CH}$) da cadeia polimérica, enquanto que as vibrações de deformação axial (*stretching*) obtidas em 1159 e 1261 cm^{-1} correspondem ao estiramento vibracional devido ao alongamento

dos grupos (C-O) e (O-C-(O)-C), respectivamente, atribuídos à presença do comonômero (HEMA) e do agente reticulante (EGDMA) na matriz polimérica. A banda observada em 1637 cm^{-1} corresponde à fração vinílica $\nu(\text{C}=\text{C})$ residual não polimerizada durante a formação da rede polimérica, enquanto a intensa banda de adsorção em 1733 cm^{-1} é atribuída ao grupo carbonila $\nu(\text{C}=\text{O})$ dos segmentos de HEMA e EGDMA da rede polimérica. A Intensidade da vibração desta banda foi suprimida para o polímero IIP-HEMA-BSA devido ao ancoramento da BSA na superfície do polímero IIP-HEMA [72-74]. Próximo a essa região a banda em 1389 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular fora do plano dos grupos metila (*umbrela*) ao passo que a banda observada em 1459 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação (C=S) da ATU presente na rede polimérica dos polímeros [73,75].

Os ombros observados em 2990 e 2958 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico do CH_2 e CH_3 da rede polimérica [76,77]. Os estiramentos simétricos, assimétricos e de deformação angular observadas em 3558 , 3481 e 3417 cm^{-1} para o IIP- Cd^{2+} e IIP-HEMA-BSA- Cd^{2+} indicam a presença de aminas primárias e secundárias livres (NH_2 e NH) do monômero ATU e da cobertura de BSA, respectivamente. Nessa região também pode ocorrer a sobreposição de vibrações ocasionado pelo estiramento da banda O-H da água fisicamente adsorvida sobre a superfície dos polímeros [78,79]. A presença de vibrações de deformação angular atribuída à amina livre são um forte indicativo de que o nitrogênio do monômero ATU não participa na coordenação ATU- Cd^{2+} .

A substituição dos estiramentos das aminas por uma banda larga em 3455 cm^{-1} atribuída às vibrações de OH do IIP-HEMA e a sobreposição da banda de deformação angular $\delta(\text{NH})$ observada em 1619 cm^{-1} estão relacionados à formação

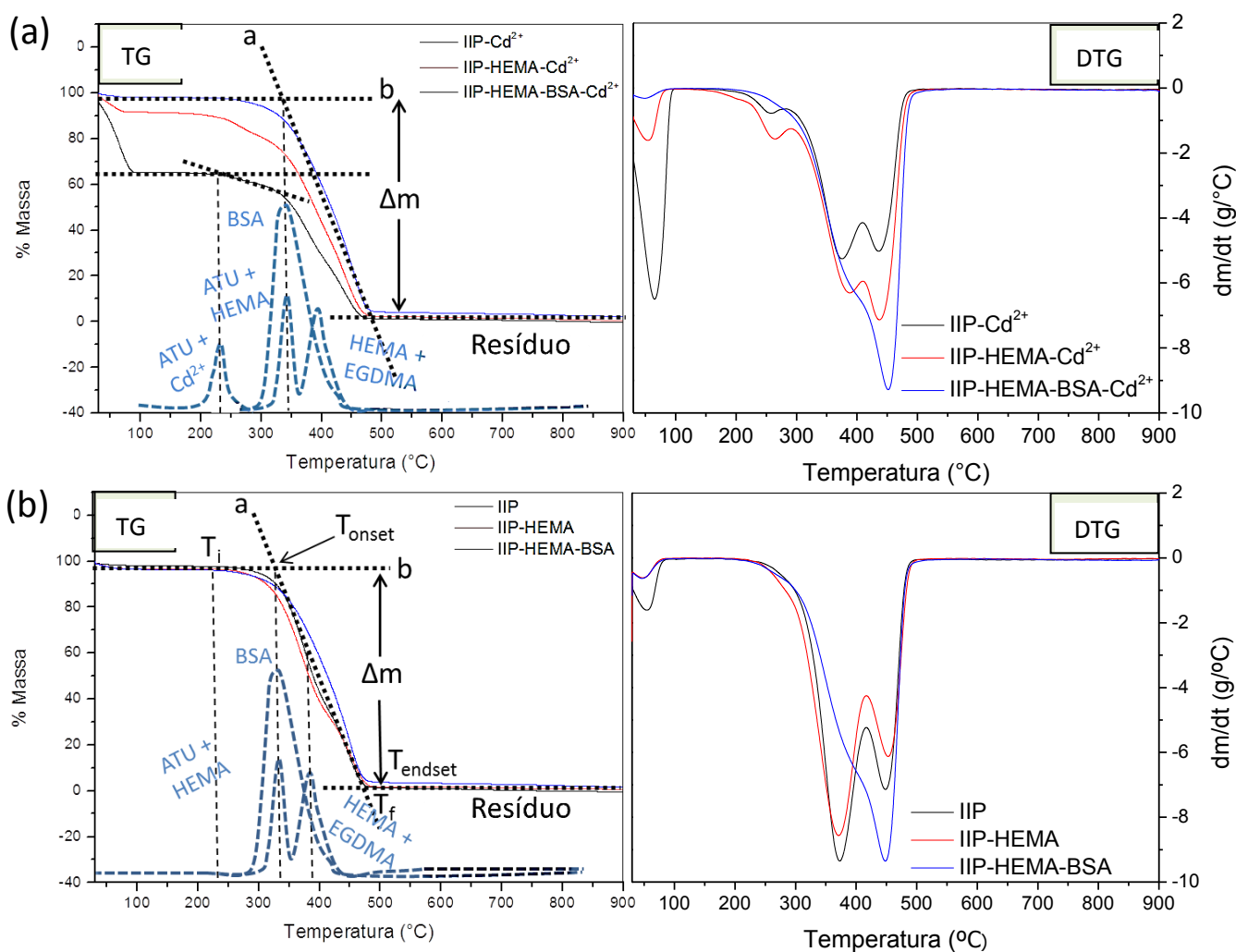
de ligações intra e intermolecular de hidrogênio causado pela presença do HEMA durante a síntese [78-81].

No espectro da ATU, a banda de absorção em 1459 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração de estiramento $\nu(\text{N-C-N})$ [82]. A coordenação do cádmio através dos átomos de enxofre da ATU pode ser observada pela supressão do estiramento encontrado em 1543 cm^{-1} para o grupo $(\text{HN-C}^+\text{-S}^-)$ conhecido como “*thioureide band*” e das bandas de deformação $\delta(\text{NCN}, \text{NCS})$ na região de $490\text{-}530\text{ cm}^{-1}$ [83]. Além disso, o deslocamento das bandas de estiramento vibracional (C=S) em 1054 cm^{-1} para 1044 cm^{-1} e das bandas observadas em $616\text{-}757\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao caráter da dupla ligação (C=S) da ATU está relacionado à coordenação do cádmio [75,82-84].

4.1.2. Análise Termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas (TG) e as curvas termogravimétricas derivadas (DTG) do IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA obtida na faixa de $30\text{-}900\text{ }^\circ\text{C}$ são apresentados nas Figuras 6, os quais foram obtidos na presença e na ausência do template.

Figura 6. Curvas termogravimétricas e a derivada das curvas termogravimétricas obtidas para os polímeros na (a) presença e (b) ausência do cádmio.



Nas curvas termogravimétricas dos materiais avaliados observou-se um evento referente a perda de água fisicamente adsorvida na faixa de temperatura de 40-70°C. A perda máxima de massa para os materiais referente à perda de água para o IIP-Cd²⁺, IIP-HEMA-Cd²⁺ e IIP-HEMA-BSA-Cd²⁺ foram de 35,3%, 8,2% e 1,8%, respectivamente, e de 7,4%, 3,3% e 3,4% para os mesmos materiais após a remoção do template. A maior perda de água fisicamente adsorvida observada para o IIP na presença e ausência do template é um indicativo da sua maior

hidrofilicidade, como será demonstrado pelo efeito de inchaço e pela molhabilidade dos materiais.

Para temperaturas mais altas, três eventos de decomposição para o IIP-Cd²⁺ e o IIP-HEMA-Cd²⁺ foram identificados pelas curvas termogravimétricas derivadas (DTG) (Figura 6 a). A interação do Cd²⁺ na matriz polimérica pode ser confirmada no primeiro evento de decomposição, obtida para a faixa de temperatura de 170,0 a 270,0 °C. Uma perda de massa de 4,1% e 9,8%, para os polímeros IIP-Cd²⁺ e IIP-HEMA-Cd²⁺, respectivamente com taxa máxima de degradação em 257,0 °C (0,8 % min⁻¹) e 264,0 °C (1,6 % min⁻¹), são atribuídos à volatilização térmica do cádmio na forma de sulfeto (CdS) dos segmentos da ATU [75,85,86]. Note que após a remoção do íon template, a temperatura T_{onset} que corresponde ao início extrapolado do evento térmico de degradação dos polímeros IIP e IIP-HEMA são deslocadas de 220 °C para aproximadamente 320 °C. A análise deste resultado e a ausência do evento de volatilização térmica do CdS observado na DTG (Figura 6a) sugere, assim como os dados de FT-IR obtidos na ausência e presença do template, a formação das cavidades de impressão em torno da coordenação cádmio-enxofre.

O segundo evento, observado na faixa de temperatura de 290-420°C, resulta em uma perda significativa de massa, 35,5% para o IIP-Cd²⁺ com taxa máxima de degradação em 376 °C (5,2% min⁻¹) e 44,2% para o polímero IIP-HEMA a uma taxa de 389°C (6,3% min⁻¹), atribuído a descarboxilação gradual de curtas cadeias dos segmentos da ATU [85,87].

O último evento obtido entre 420°C e 475°C corresponde ao processo de decomposição, por descarboxilação gradual de segmentos orgânicos do HEMA e EGDMA [75,86], obtido para os polímeros IIP e IIP-HEMA a uma taxa máxima de

degradação de 437°C (5,0% min⁻¹) e 438 °C (7,1% min⁻¹) com uma perda de massa de 24,0% e 34,1%, respectivamente.

Para o polímero IIP-HEMA-BSA não foi observada a separação dos eventos referente à decomposição dos segmentos da cadeia polimérica (ATU, HEMA, EGDMA e BSA) na faixa de temperatura de 240 a 490 °C. Estes resultados sugerem que existe a formação de interações (dipolo-dipolo, dispersão de London e ligações de hidrogênio) entre a rede polimérica e a BSA, deslocando a taxa máxima de decomposição para 452°C (9,3% min⁻¹) [88]. Comportamento similar foi observado para o polímero IIP-HEMA-BSA na ausência do Cd²⁺. Segundo Santos et al. (2015), o revestimento proteico na superfície do material ocorre por meio de duas etapas. Primeiro, ocorre a reação entre os grupos amina da molécula de BSA e os grupos aldeído do glutaraldeído (agente de reticulação). O grupo aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e os grupos amino de outra molécula da BSA formam a rede polimérica em torno do IIP-HEMA. A reação entre o glutaraldeído e a BSA resulta em iminas instáveis e o uso da solução de borohidreto de sódio durante a síntese, reduz as iminas para aminas (mais estáveis) [39].

Na ausência do template, a decomposição dos segmentos da ATU dos polímeros IIP e IIP-HEMA (sem Cd²⁺) é deslocada para temperaturas mais altas e a degradação do polímero, ocorre com sobreposição a descarboxilação do comonômero e agente de ligação cruzada. Para os dois polímeros a taxa máxima de degradação foi alcançada em 373 °C (9,4 % min⁻¹) e 371 (8,6 % min⁻¹) com uma perda significativa de massa de 60,0% e 65,0%, respectivamente.

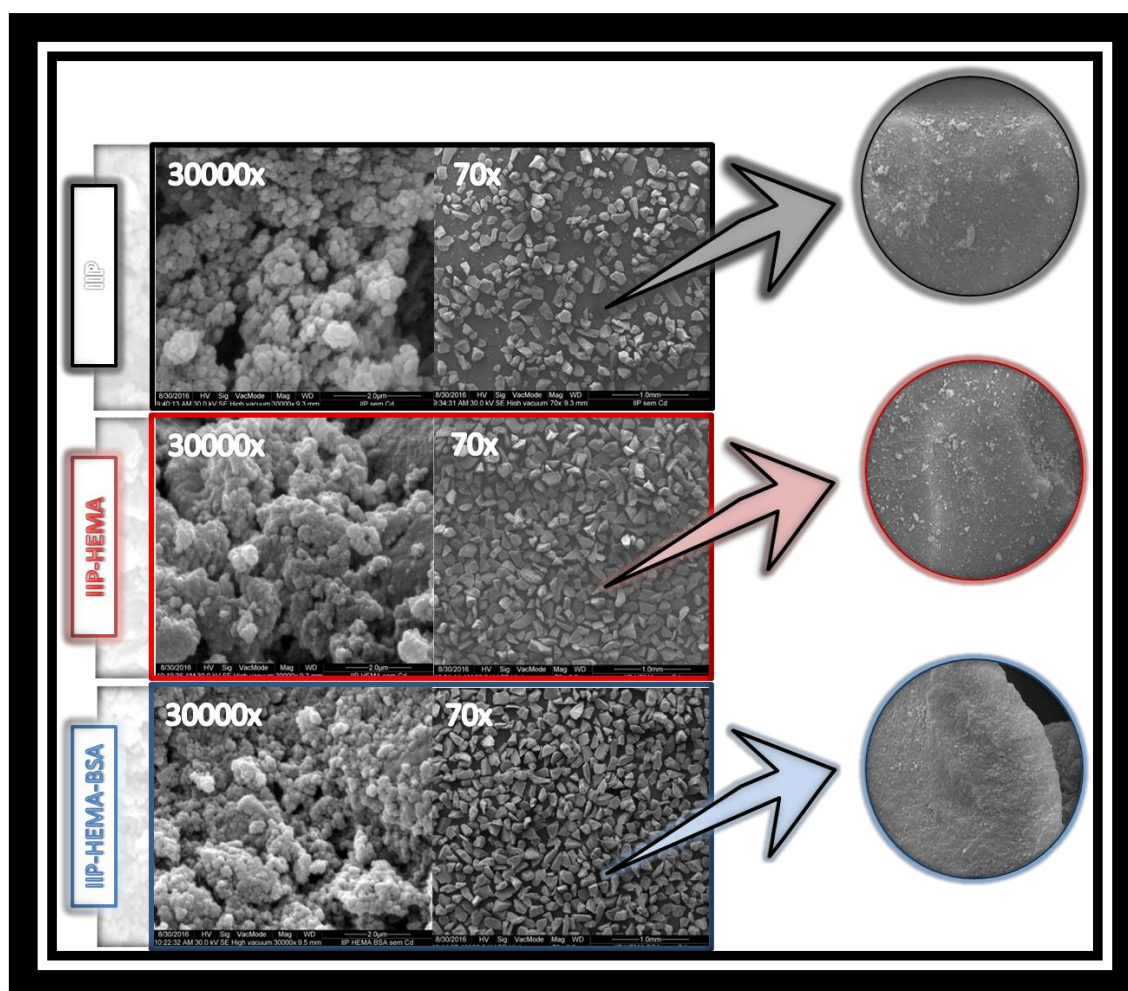
Esses resultados demonstram que os polímeros quimicamente modificados (IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA) apresentam menor perda de água, o que nos permite inferir que o efeito de inchaço/molhabilidade dos polímeros não tem dependência

restrita apenas à camada hidrofílica, dependem também da porosidade dos polímeros, assim como tem sugerido alguns trabalhos da literatura [56,64].

4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Fisissorção de N₂

As imagens de MEV (Figura 7) obtidas para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, são similares entre si mostrando tamanho e forma irregulares que são características dos processos de polimerização em *bulk* (meio homogêneo) [89].

Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura obtida para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA com ampliação de 70 e 30000 vezes.



A explicação para essa diferença morfológica pode estar relacionada à presença do comonômero hidrofílico HEMA. A solubilidade do meio aumenta na presença do comonômero e a taxa de volatilização do solvente ocorre em um estágio posterior àquelas obtidas na ausência do HEMA, dificultando a remoção do solvente dos interstícios da rede. O resultado é a formação de menores interstícios, de núcleos pequenos e interconectados por meio de ligações de hidrogênio, resultando em uma rede polimérica mais reticulada, com menor área superficial, volume e diâmetro de poro, como mostra a Tabela 2 [90,91].

Tabela 2. Parâmetros texturais obtidos para os polímeros antes e após a remoção do cádmio.

| Polímero | Área Superficial (m ² g ⁻¹) | Volume de Poro (cm ³ g ⁻¹) | Diâmetro médio de poro (nm) |
|-------------------------------|---|--|--------------------------------|
| IIP-Cd ²⁺ | 316,7 | 0,752 | 10,74 |
| IIP | 268,3 | 1,295 | 20,36 |
| IIP-HEMA-Cd ²⁺ | 189,5 | 0,587 | 13,30 |
| IIP-HEMA | 198,6 | 0,550 | 12,04 |
| IIP-HEMA-BSA-Cd ²⁺ | 132,5 | 0,411 | 13,32 |
| IIP-HEMA-BSA | 136,5 | 0,436 | 13,67 |

Em contrapartida, a solubilidade do meio diminui na ausência do HEMA e a saída do solvente porogênico dos interstícios da rede polimérica é acelerada. Dessa forma, a polimerização continua em torno dos núcleos iniciais de polimerização, formando partículas maiores em tamanho de poro e, portanto um material menos coeso ao qual é atribuído o maior volume e diâmetro de poro do IIP [91,92].

Como esperado, a menor porosidade obtida para o polímero IIP-HEMA-BSA, indicam que a BSA diminui a área superficial do IIP-HEMA, provavelmente devido ao preenchimento dos poros causado pelas ligações de hidrogênio formadas pelo revestimento da BSA na superfície do polímero [41]. De acordo com a IUPAC, os

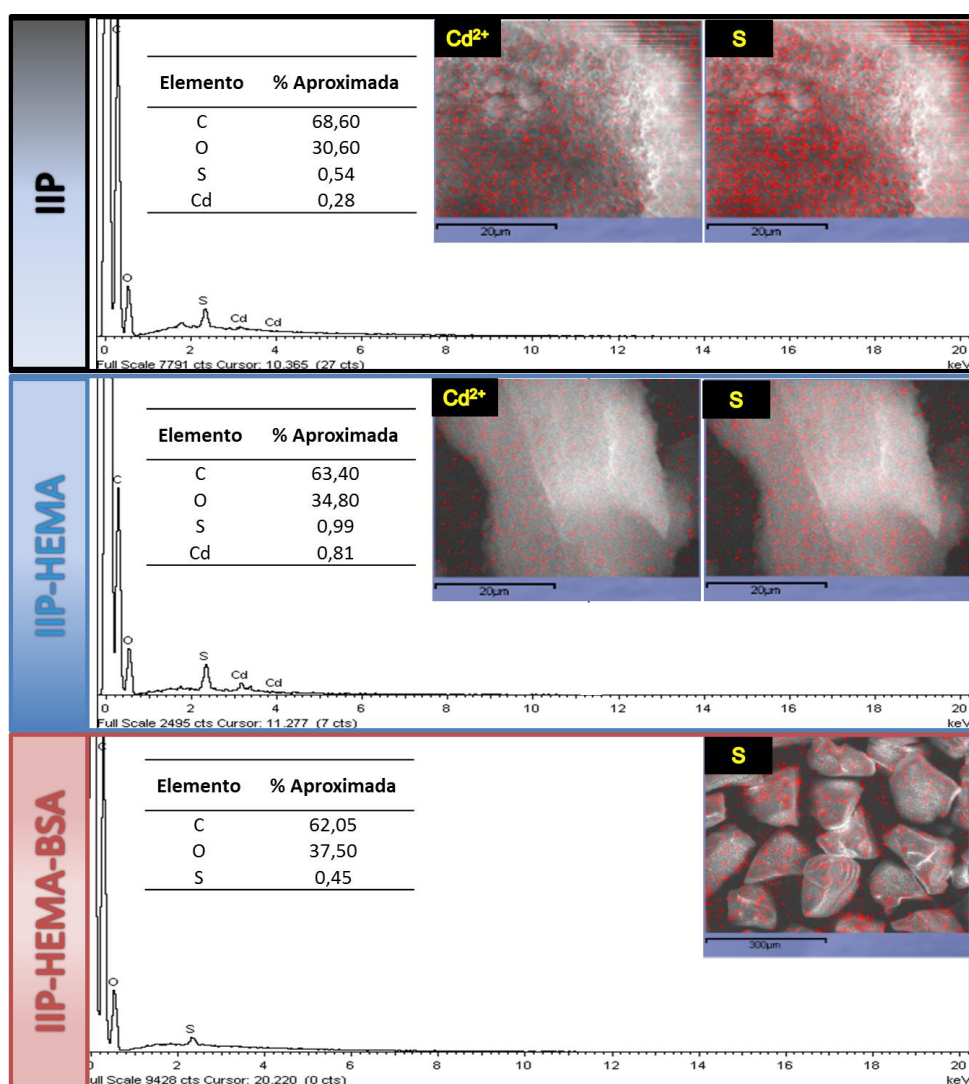
materiais IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA são classificados como mesoporosos (diâmetro médio de poro entre 2,0-50,0 nm) [93]. A diminuição do volume e diâmetro de poro obtidas para os polímeros IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, sugere que o efeito sinérgico monômero-comonômero e BSA-comonômero, atribuído ao acesso restrito, foram criadas sobre a superfície do IIP.

A fim de confirmar se a seletividade dos polímeros pode ser atribuída à maior quantidade de ATU na matriz polimérica ou ocasionada pelo efeito de impressão criado durante a síntese dos polímeros impressos IIP-Cd²⁺, IIP-HEMA-Cd²⁺ e IIP-HEMA-BSA-Cd²⁺, os polímeros não impressos (NIP, NIP-HEMA e NIP-HEMA-BSA) foram sintetizados e submetidos à análise elementar por CHNS e estudos de seletividade, como serão demonstrados nas seções 4.1.5 e 4.6, respectivamente.

4.1.4. Mapeamento e Distribuição Elementar obtida por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Adicionalmente, a análise por EDS foi realizada para os polímeros IIP-Cd²⁺, IIP-HEMA-Cd²⁺ e IIP-HEMA-BSA-Cd²⁺ e o espectro de energia vs contagem relativa de raios-X foram utilizados para a determinação qualitativa dos átomos de oxigênio e confirmar a presença de cádmio e enxofre dos sítios impressão presentes na rede polimérica. A Figura 8 apresenta os espectros de EDS obtidos para os polímeros e o mapeamento elementar dos átomos de cádmio e enxofre.

Figura 8. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e mapeamento dos átomos de enxofre e cádmio obtido para os polímeros IIP-Cd²⁺, IIP-HEMA-Cd²⁺ e IIP-HEMA-BSA-Cd²⁺.



A partir das análises de EDS a presença dos átomos Cd²⁺ e S na matriz polimérica foram detectadas nas regiões de 3,1 keV e 2,3 keV, respectivamente, com valores percentuais (% em massa) na faixa de 0,18-0,30% e 0,54-0,57% para o IIP e aproximadamente 0,68-0,94% e 0,88-1,02% para os o IIP-HEMA e o IIP-HEMA-BSA, respectivamente [94,95].

Do mapeamento pode-se observar que a distribuição dos átomos de S e Cd^{2+} (representado com pontos vermelhos) ocorreu de forma homogênea na superfície dos polímeros, sendo uma importante característica para a aplicação destes materiais em procedimentos de pré-concentração de Cd^{2+} . Os teores de S obtidos para o IIP e o IIP-HEMA e atribuído à presença da ATU, foram quantitativamente determinados por análise elementar CHNS (sessão 4.1.5).

Para o espectro obtido para o IIP-HEMA-BSA- Cd^{2+} foi possível a identificação dos átomos de S (resíduos de cisteína do ancoramento da BSA e ATU do monômero), Entretanto, devido à dificuldade de excitação dos átomos de cádmio causado pelo revestimento proteico da BSA, os espectros de raios-X característicos do metal não foram identificados por EDS [96]. Porém, cabe salientar que o ancoramento da BSA foi realizado diretamente sobre a superfície do polímero IIP-HEMA- Cd^{2+} submetido à análise.

4.1.5. Análise Elementar CHNS

Para avaliar a taxa de conversão e a percentagem molar final de ATU, HEMA e EGDMA, o IIP, NIP, IIP-HEMA e NIP-HEMA foram submetidos à análise elementar por CHNS. Como mostra a Tabela 3, as porcentagens molares iniciais e finais de ATU, HEMA e EGDMA foram muito semelhantes para os polímeros impressos e não impressos, mostrando assim que a taxa de conversão não depende da presença do template (Cd^{2+}).

As taxas de conversão obtidas para a ATU foram de 85,2%, 86,1%, 85,6% e 86,8% enquanto que a taxa de conversão do EGDMA foi de 101,2%, 101,2%, 100,1% e 100,4%, ambas para o IIP, NIP, IIP-HEMA e NIP-HEMA, respectivamente.

Os resultados também sugerem que a presença do comonômero HEMA na síntese não tem influência significativa na taxa de conversão de ATU ou EGDMA.

Tabela 3. Determinação da percentagem molar (mmol %) da ATU, EGDMA e HEMA na estrutura do polímero usando análise elementar por CHNS.

| Monômero, Agente de ligação cruzada e Comonômero | Antes da polimerização | | Após a polimerização |
|--|------------------------|----------|----------------------|
| | | IIP | |
| ATU | 7,69 | | 6,55 |
| EGDMA | 92,3 | | 93,4 |
| HEMA | - | | - |
| | | NIP | |
| ATU | 7,69 | | 6,62 |
| EGDMA | 92,3 | | 93,4 |
| HEMA | - | | - |
| | | IIP-HEMA | |
| ATU | 6,67 | | 5,71 |
| EGDMA | 80,0 | | 80,1 |
| HEMA | 13,3 | | 14,2 |
| | | NIP-HEMA | |
| ATU | 6,67 | | 5,80 |
| EGDMA | 80,0 | | 80,3 |
| HEMA | 13,3 | | 13,9 |

Como, as porcentagens finais de enxofre obtidas pela conversão da ATU para os polímeros impressos (IIP e IIP-HEMA) e não impressos (NIP e NIP-HEMA) também são similares, com valores de 1,90%, 1,34%, 1,62 % e 1,86%, respectivamente, podemos concluir que a seletividade não depende da taxa de conversão da ATU, mas sim atribuída às cavidades de impressão criadas durante a formação da matriz polimérica (como será demonstrado mais a frente na seção 4.6),.

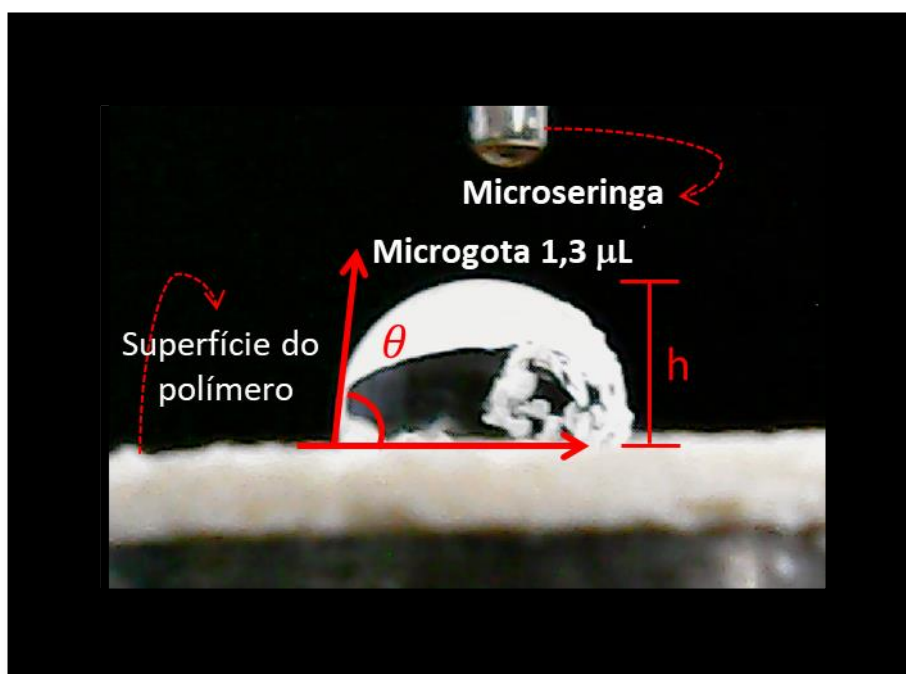
A análise elementar CHNS não foi realizada para o polímero IIP-HEMA-BSA devido à alta complexidade atribuída aos vários grupos de aminoácidos inseridos na

superfície do material como resíduos de cisteína (sulfidríla), grupos doadores de nitrogênio do anel imidazol da histidina, triptofano e resíduos de tirosina [97].

4.2. Hidrofilicidade e Swelling Effect (SE)

As forças capilares que atuam na absorção da gota de água ou agem no sentido de prevenir e impedir sua entrada nos poros depende das propriedades química e física dos materiais. Dependendo das propriedades da superfície as forças capilares podem ser positivas ou negativas (Figura 9).

Figura 9. Imagem da gota séssil sobre a superfície do polímero obtida sobre o fundo totalmente escuro.

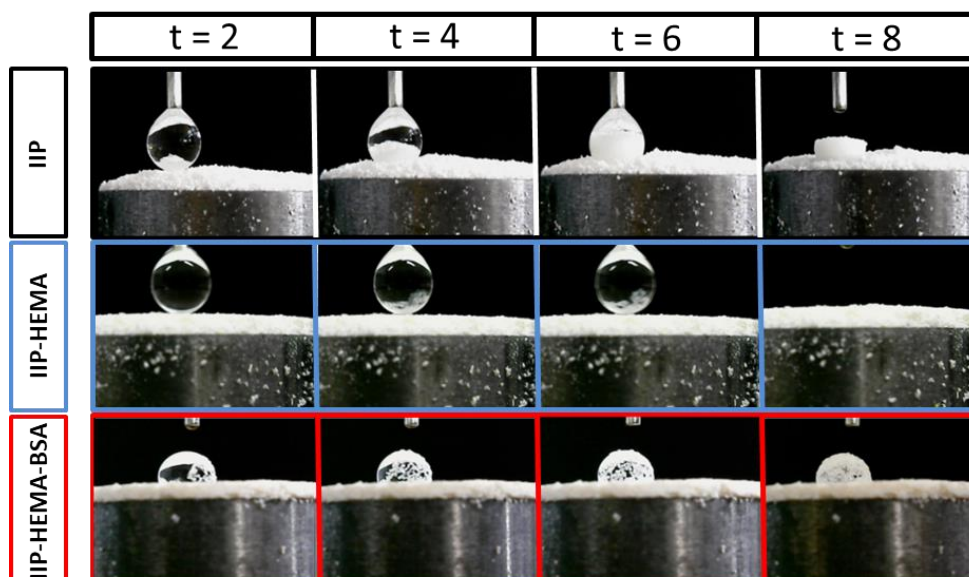


Superfícies hidrofílicas com ângulos de contato $\theta < 90^\circ$ geram pressões capilares positivas, favorecendo a entrada de água nos poros dos materiais, enquanto que superfícies hidrofóbicas com ângulos de contato $\theta > 90^\circ$ geram

pressões capilares negativas, impedindo a entrada de água nos poros. A magnitude das forças capilares (positiva ou negativa) é inversamente proporcional ao diâmetro de poro dos polímeros e é estritamente influenciada pela não homogeneidade topográfica causada pela rugosidade da superfície [98].

A Figura 10 apresenta as imagens das microgotas de água estática na superfície dos polímeros compactada em forma de disco obtido em diferentes tempos. Dos resultados, é possível observar que o total de água absorvido depende tanto das forças capilares causadas pela coesão entre as moléculas do líquido sobre a superfície do polímero quanto da porosidade obtida para os materiais.

Figure 10. Imagens de contato entre a microgota de água e a superfície dos polímeros em diferentes tempos.



A partir das imagens, como pode ser observado, devido à superfície rugosa do polímero IIP, as partículas foram incorporadas na gota de água mostrando uma rápida desintegração da superfície causada pela forte interação polímero-água. Por outro lado, a superfície plana do polímero IIP-HEMA, a qual se apresenta mais coesa que o polímero IIP, resulta no espalhamento rápido da gota de água sobre a

superfície, exibindo suas características hidrofílicas. Em contrapartida, com o revestimento da BSA, diminui-se significativamente o tamanho de poro do polímero IIP-HEMA-BSA (Tabela 2) gerando forças capilares negativas entre as moléculas da gota de água e a superfície, impedindo a entrada das moléculas de água nos poros do material, observado pelo aumento do tempo de contato superfície-gota [99].

De modo geral, os resultados indicam que os polímeros são hidrofílicos. Entretanto, a afinidade da água pelo IIP é muito maior quando comparado aos polímeros quimicamente modificados, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Podemos afirmar, nesse caso, que a magnitude da força capilar é proporcional à porosidade dos materiais, enquanto a presença de superfícies menos porosas e menor volume de poro geram fortes pressões capilares negativas que impedem a entrada de água nos poros, como observado para o IIP-HEMA-BSA [99,100]. Em acordo com o observado para a molhabilidade, os resultados obtidos para o efeito de inchaço (Tabela 4), realmente demonstram a maior hidrofiliabilidade do polímero IIP com uma porcentagem de aumento de 207,7% da massa inicial, aproximadamente 2,4 vezes maior que o efeito de inchaço obtido para o IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, o que pode ser atribuído, novamente à maior porosidade do material sem acesso restrito.

Tabela 4. Hidrofiliabilidade da superfície dos polímeros com base em medidas de Swelling Effect (SE).

| Polímero | SE (% \pm DPR)* |
|--------------|-------------------|
| IIP | 207.7 \pm 6.6 |
| IIP-HEMA | 88.5 \pm 8.8 |
| IIP-HEMA-BSA | 87.2 \pm 0.1 |

*Resultados são expressos como valor médio (%) \pm Desvio Padrão Relativo (n=5)

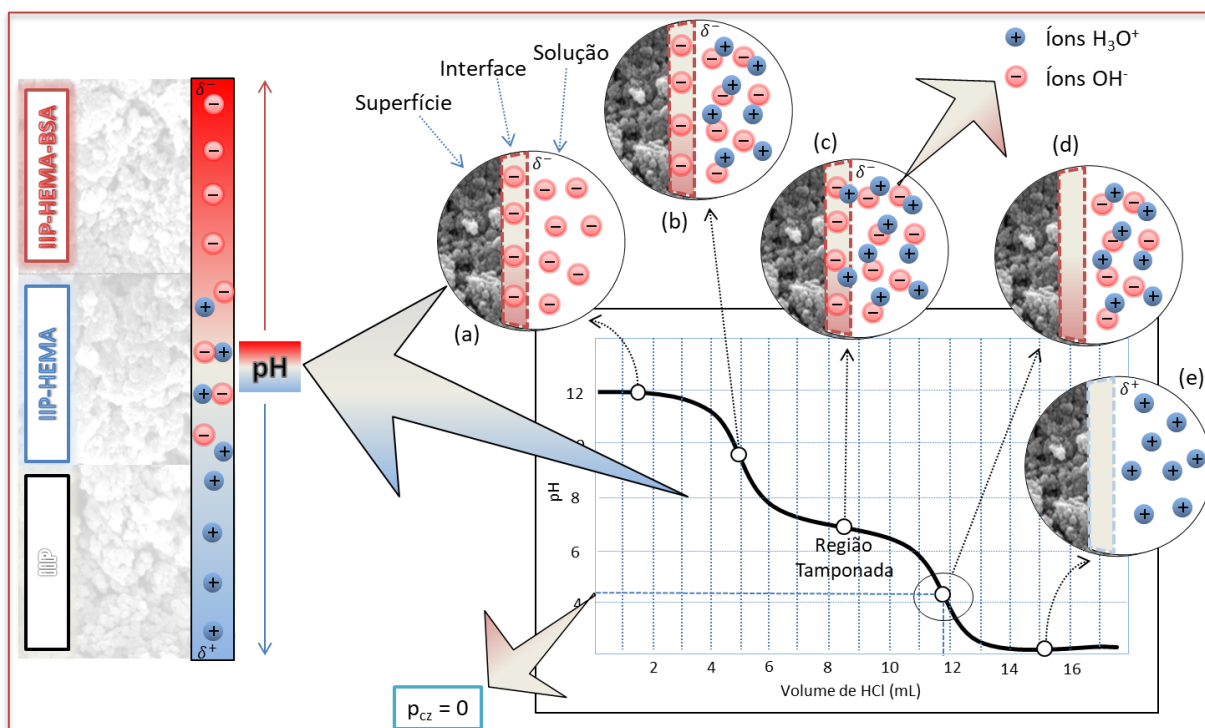
Cabe ressaltar que o maior grau de reticulação da rede polimérica pode aumentar a hidrofobicidade e influenciar na molhabilidade, efeito de inchaço do material e na rigidez da cavidade seletiva, como tem sido descrito na literatura [101].

Dessa forma, o tamanho das partículas formadas durante a síntese pode ser o fator preponderante no grau de adesão entre a gota de água e a superfície dos polímeros. Como a porcentagem do agente de ligação cruzada na ausência do comonômero é maior que 90,0 % (Tabela 3), logo um maior grau de reticulação da rede para o polímero IIP é esperado [102]. Entretanto, na ausência do HEMA, a saída do solvente porogênico dos interstícios da rede polimérica é acelerada e o radical do monômero, menos favoráveis ao solvente, preferem crescer nos núcleos de precipitação inicial (oligômeros). Como resultado, a posterior polimerização e reticulação estão principalmente nesses núcleos de crescimento e as partículas finais são maiores em tamanho e apresentam uma superfície de textura rugosa (heterogênea) e estruturalmente porosa, na qual a hidrofiliabilidade do polímero IIP é justificada [103].

4.3. Ponto de Carga Zero (p_{cz})

A Figura 11 ilustra o mecanismo para a determinação do p_{cz} do IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA a partir da titulação potenciométrica.

Figura 11. Mecanismo de determinação do p_{cz} dos polímeros obtidos a partir da titulação potenciométrica.



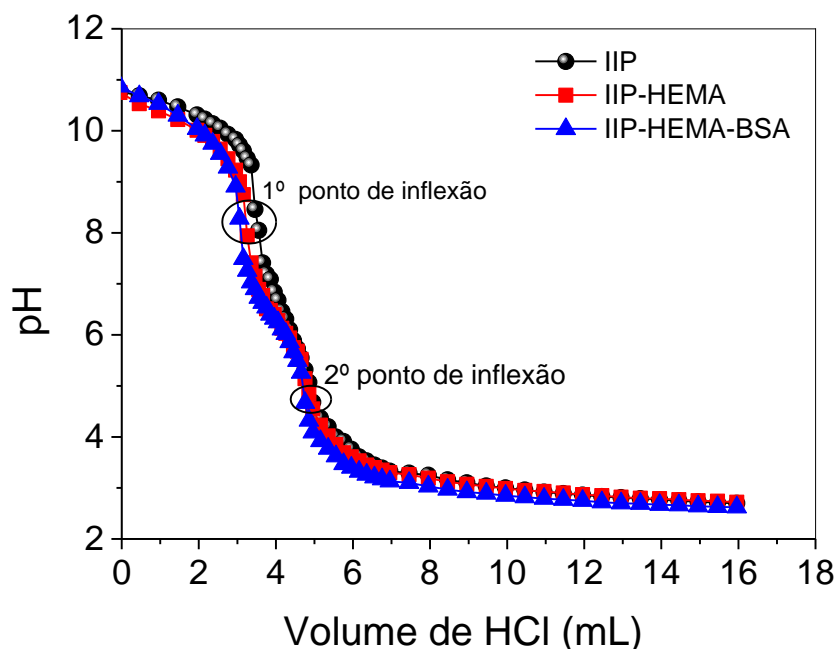
No início (Figura 11a) o excesso de íons hidroxila (OH^-) predominam em solução e a alta densidade de carga negativa prevalece na superfície dos polímeros. Conforme o HCl é titulado, o pH do meio vai diminuindo até atingir o primeiro ponto de inflexão (Figura 11 b), indicando a neutralização do excesso de OH^- adicionado. Note que, nessa região a densidade de carga negativa permanece na superfície do polímero titulado. Desse ponto em diante, o titulante reduz significativamente a densidade de carga superficial até atingir uma região tamponada (Figura 11c). Esse intervalo de pH é caracterizado pelo equilíbrio entre cargas negativas e positivas na superfície dos polímeros.

O ponto de carga zero, $p_{cz} = 0$ (carga líquida superficial é zero) (Figura 11d), é obtido a partir do segundo ponto de inflexão da titulação ácido-base, indicando o pH que correspondente à neutralização dos grupos tiol, hidroxila, ácido carboxílicos,

grupos aminos e enxofre da superfície do IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA [104,105]. Esse ponto estabelece uma linha tênue entre a região de protonação e desprotonação dos grupos funcionais dos polímeros [106,107].

Finalmente, o excesso de íons hidrônio (H_3O^+) predominam em solução e o pH do meio passa a ser menor que o $pH_{p_{cz}}$ da superfície dos polímeros, o que resulta na inversão de cargas e uma superfície carregada positivamente (Figura 11e) [107,108]. A curva de titulação potenciométrica e os pontos de inflexão da superfície do IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA são apresentados na Figura 12.

Figura 12. Curva de titulação obtida para 15,0 mg de cada polímero em NaOH ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) titulado com HCl ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O círculo representa o primeiro e segundo ponto de inflexão ($pH_{p_{cz}}$) de cada material.



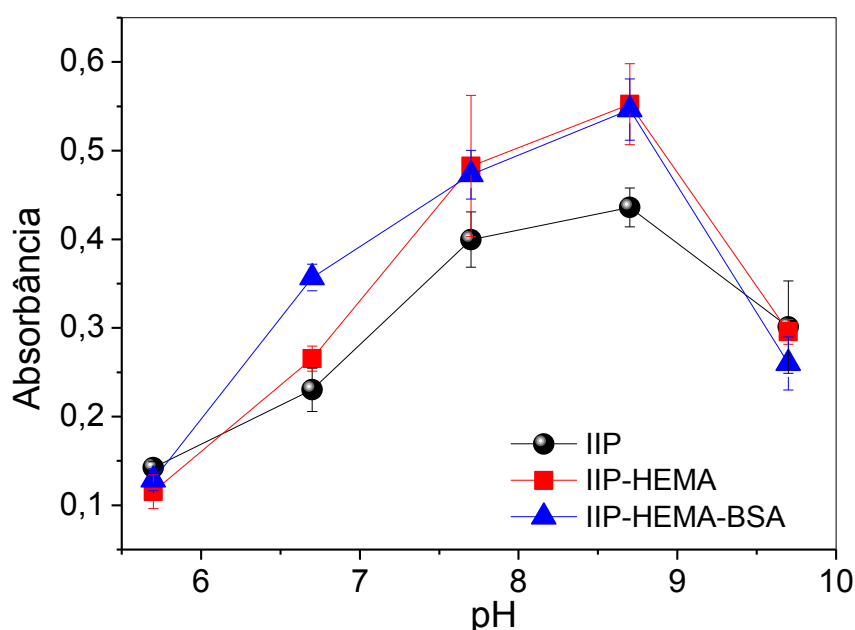
A partir da segunda derivada ($\frac{\partial^2 pH}{\partial V_{HCl}}$) do segundo ponto de inflexão das curvas de titulação, o pH no qual ocorreu a inversão de polarização de cargas para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA foram respectivamente, 4,29, 4,67 e

4,70. O valor de p_{cz} obtido para o polímero com cobertura proteica tem sido corroborado com os dados da literatura [109]. O efeito do $pH_{p_{cz}}$ dos polímeros na capacidade de extração/pré-concentração de cádmio e simultânea exclusão de macromoléculas serão demonstrados nos estudos da influência do pH.

4.4. Efeito do pH na sorção de cádmio

O efeito da influência do pH na sorção de Cd^{2+} pelos materiais IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA é mostrada na Figura 13.

Figure 13. Influência do pH na sorção de cádmio para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: $50,0 \mu g L^{-1}$ de Cd^{2+} tamponadas em acetato (pH 5,70), fosfórico (pH 6,70), tris-HCl (pH 7,70 e 8,70) e amônio (pH 9,70) com concentração de $0,1 mol L^{-1}$.



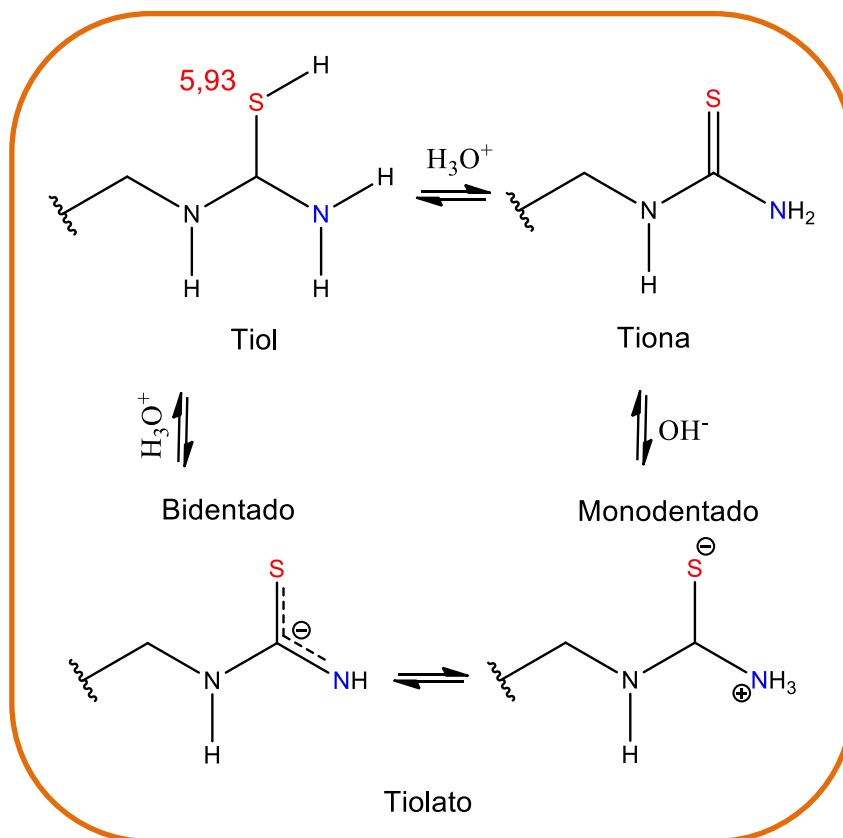
Baseado no princípio denominado “*Hard Soft Acid Base Principle*” (HSAB), definido por Pearson, cádmio é um ácido mole de Lewis que tem preferência por bases moles (ligantes doadores de elétrons) como os átomos de enxofre [110].

Como observado, próximo à região de p_{cz} dos polímeros (pHs mais baixos), o excesso de íons H_3O^+ realoca os elétrons π dos átomos de enxofre do grupo tiouréia (NH-C=S) deslocando o equilíbrio tautomérico para a forma protonada, tiol (C-SH) presentes na ATU [111]. A densidade de carga negativa na superfície dos polímeros diminui, blindando os átomos doadores de elétrons. Em decorrência disso, o aumento de cargas superficiais positivas repele as cargas positivas de íons Cd^{2+} do meio, diminuindo a intensidade do sinal [112].

Considerando o pKa do grupo tiol (S-H, 5,93), à medida que o pH é deslocado para regiões acima de 5,70 o equilíbrio tautomérico tiol/tiona dos segmentos da ATU é deslocada para a forma desprotonada (íon tiolato) [113], de acordo com a Figura 14. A desprotonação do grupo tioureia promove o aumento da densidade de carga superficial (negativa), facilitando as interações eletrostáticas entre a superfície e a fração de Cd^{2+} , $[Cd(H_2O)_6]^{2+}$, $Cd(OH)^+$ e $Cd^2(OH)^{3+}$ presentes em solução. Para os três polímeros, a capacidade máxima de sorção de Cd^{2+} foi observada em pH 8,70 [114-117].

Para regiões mais alcalinas (pH 9,70), a fração de $Cd(OH)_2$ (não iônica) e das espécies aniônicas $Cd(OH)^{2-}$, $Cd(OH)^{3-}$ e $Cd(OH)_4^{2-}$ aumentam, diminuindo a intensidade de sinal, muito provavelmente pela repulsão eletrostática causada entre a superfície do polímero carregada negativamente e os ânions do meio [112,118-120].

Figura 14. Equilíbrio tautomérico tiol/tiona/tiolato do grupo tioureia (NH-C=S) presentes na rede polimérica.



A partir do equilíbrio apresentado na Figura 14 verifica-se que o Cd^{2+} pode se coordenar com o grupo tiouréia de forma monodentada, via átomos doadores de enxofre, e ainda, dependendo do deslocamento da ligação π e do tipo de metal, funcionar como ligante bidentado, permitindo o caráter parcialmente duplo da ligação devido à deslocalização desses elétrons entre o átomo de enxofre e nitrogênio [113].

Tendo em vista a dualidade de caráter da ATU, as duas possibilidades são plausíveis (interação mono ou bidentada) de afinidade com o Cd^{2+} , uma vez que o nitrogênio é uma base mole. Para Suquila et al. (2018), Feng et al. (2015) e Ding et al. (2018) a coordenação de ácidos intermediários e moles de Pearson, Cu^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , respectivamente, ocorrem via átomo de enxofre [56,121,122] embora alguns autores divergem quanto ao comportamento da coordenação [82]. Nesse caso,

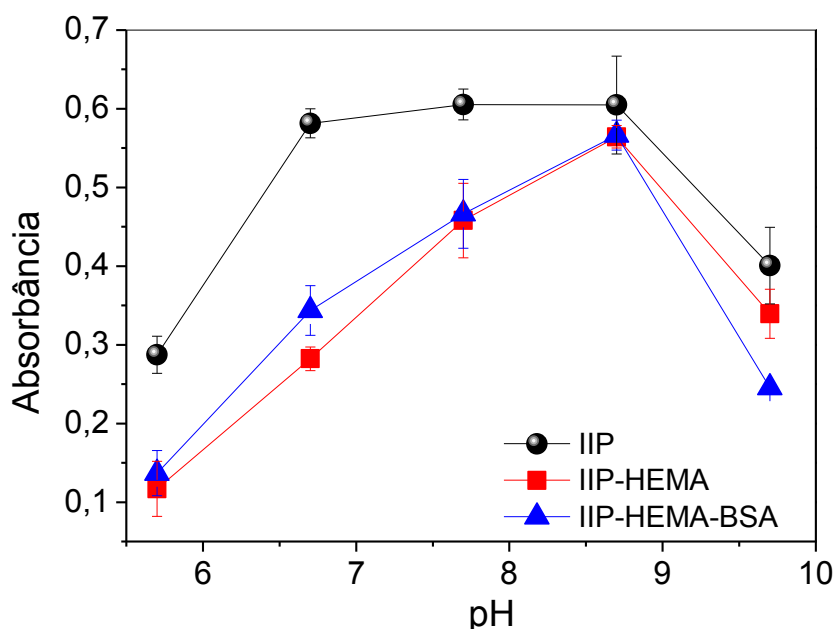
especificamente, a supressão do estiramento da banda conhecida como “*thioureide band*” do grupo (HN-C⁺-S⁻) observado para os dados de FT-IR da ATU, indicam que o átomo de enxofre permite a deslocalização mais acentuada dos elétrons π para os íons Cd²⁺, ao qual é atribuída a coordenação para os polímeros [114,115].

Vale ressaltar que, apesar da menor porosidade obtida para os polímeros quimicamente modificados IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA comparadas o IIP, a intensidade de sinal analítico obtidas para o Cd²⁺ foram superiores para todos os pHs avaliados no IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA em relação ao IIP. No caso destes, a inserção de grupos hidroxila do HEMA e resíduos de cisteína (Cys) e histidina (His) contendo grupos carboxílicos, aminas e fragmentos de enxofre, presentes no revestimento da BSA, contribuíram para o aumento de grupos funcionais desprotonados [123]. Conforme o pH do meio se afasta do pH_{p_{cz}} dos polímeros, mais carga superficial negativa é induzida, proporcionalmente a quantidade de grupos desprotonados na superfície, resultando em maiores intensidades de sinal quando comparado ao polímero sem modificação IIP [124]. Portanto, a maior quantidade de grupos funcionais inseridos na superfície dos polímeros modificados IIP e IIP-HEMA-BSA desempenha um papel mais importante na sorção de cádmio do que as características morfológicas de porosidade e hidrofiliicidade obtidas para o IIP.

4.5. Efeito do pH na pré-concentração de cádmio e simultânea exclusão de Ácido Húmico (AH)

A influência dos AHs na pré-concentração de Cd²⁺ pelos materiais IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA em diferentes pH são apresentadas na Figura 15.

Figura 15. Efeito do pH na taxa de sorção de cádmio na presença de AH. Condições: $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} na presença de AH $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ tamponadas em acetato (pH 5,70), fosfórico (pH 6,70), tris-HCl (pH 7,70 e 8,70) e amônio (pH 9,70) com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Como o $\text{pH}_{\text{p}_{\text{cz}}}$ do HA é de aproximadamente 1,9, é importante ter em mente que a substância húmica se mantém carregada negativamente durante toda faixa de pH (5,7-9,7) [125] e, portanto o aumento de pH expõe mais grupos funcionais para a sorção de Cd^{2+} . Partindo desta perspectiva, dois fatores predominantes devem ser considerados no processo de exclusão da substância húmica. Primeiro, o Cd^{2+} pode interagir facilmente com o HA desprotonado, e o complexo Cd^{2+} -AH deve coexistir em solução durante toda a extensão avaliada [125,126]. Além disso, é esperada maior quantidade de Cd^{2+} -HA sorvido na superfície dos polímeros quando o pH do meio é inferior ao $\text{pH}_{\text{p}_{\text{cz}}}$ dos polímeros [127,128].

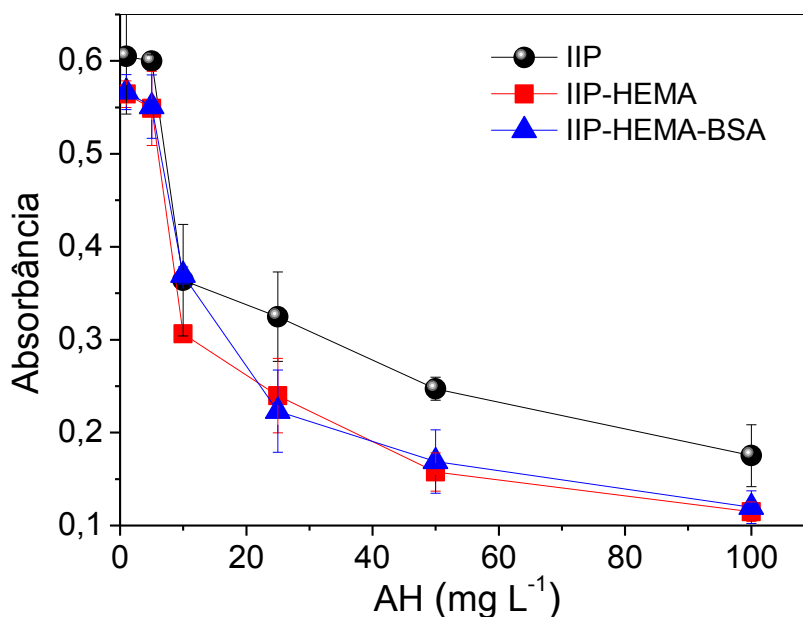
No entanto, como mostra a Figura 15, é possível observar que o perfil de pré-concentração obtido para os polímeros IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA na presença de AH $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ é semelhante aqueles obtidos na ausência da substância. Esse

efeito, causado pela presença dos modificadores químicos pode ser atribuído ao afastamento da região de $pH_{p_{cz}}$ dos polímeros. Novamente, a presença do HEMA e da BSA expõe mais carga superficial negativa e promove a repulsão eletrostática entre a superfície do polímero e a substância húmica. Essa capacidade dos polímeros modificados permite simultaneamente, a exclusão do AH e a pré-concentração de Cd^{2+} .

Por outro lado, o comportamento observado para o polímero IIP, na ausência e presença de HA, demonstra que a densidade de carga negativa em torno da superfície do polímero sem modificação não é suficiente para evitar as interações do AH. Como consequência, o aumento da intensidade de sinal é atribuído à coordenação do complexo $AH-Cd^{2+}$ à superfície do IIP. De fato, a aproximação de centros doadores de elétrons da substância húmica, como ácidos de grupos carboxílicos, aminas e fragmentos de enxofre, como resíduos funcionais de organossulfúricos $(R)_nS$, $(R)_nSO$ e $(R)_nSH$, pode coordenar íons Cd^{2+} do meio, aumentando assim, a intensidade do sinal para o IIP [129,130].

É de suma importância destacar que a avaliação e a definição do material para o desenvolvimento analítico do método é baseada na capacidade de sorção de Cd^{2+} e simultânea exclusão das substâncias húmicas. Portanto, como a concentração de AH presente em amostras de águas naturais pode variar de 0,1 a 100,0 $mg L^{-1}$ [131,132], um estudo mais detalhado do efeito da concentração de AH sobre a capacidade dos polímeros, principalmente dos modificadores químicos, na exclusão de AH foi realizado (Figura 16).

Figure 16. Efeito da concentração de HA na taxa de sorção de Cd^{2+} obtida para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: pH 8,70, $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} na presença de HA 1,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$.

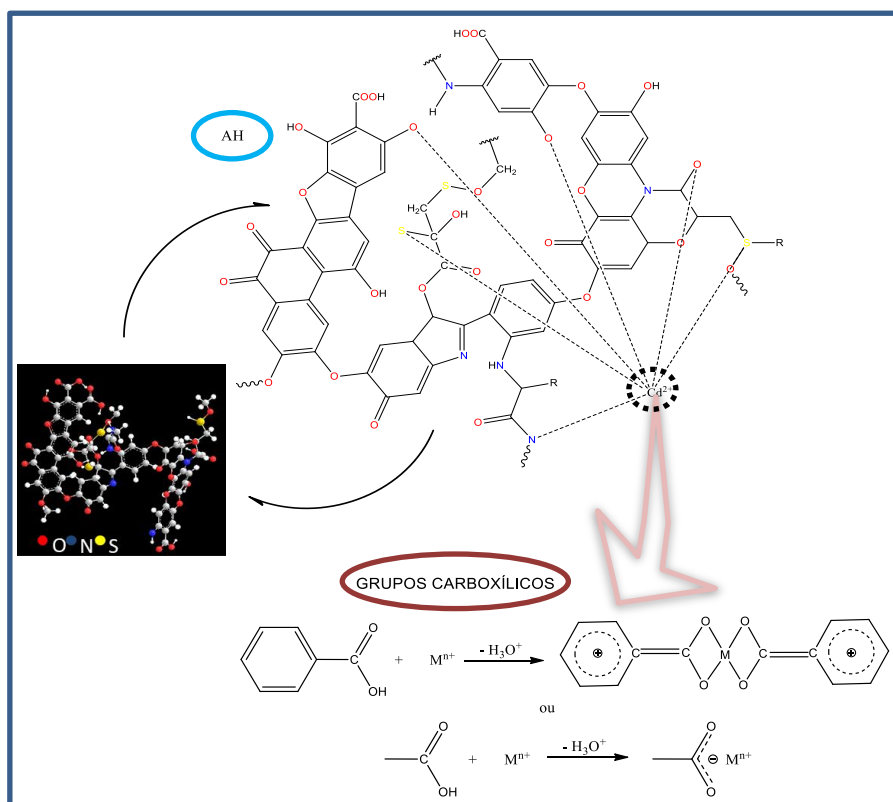


Assim como Zeng et al. (2015) e Chen et al. (2019), os resultados demonstram que o aumento da concentração de AH (maior disponibilidade de grupos funcionais) resultou na diminuição da quantidade de metal livre atribuída a coordenação do íon a macromolécula [131,132]. Não foram observadas diferenças significativas nos sinais analíticos de Cd^{2+} na presença de AH até a concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Entretanto, acima dessa concentração, é possível observar a diminuição exponencial na intensidade de sinal do Cd^{2+} causada pela presença da substância húmica.

Na presença de AH $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, a capacidade de sorção dos polímeros IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, diminui em cerca de 56,0% e 67,0%, respectivamente. Quando a concentração do AH atinge $50,0 \text{ mg L}^{-1}$, em média 70,0% dos íons Cd^{2+} do meio são excluídos com a substância húmica, chegando a uma porcentagem de 80,0% quando a concentração de AH passa a ser de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Como o AH é basicamente composto de 45-60% de carbono, 30-35% de oxigênio, 3-7% de nitrogênio e 1-3% de enxofre, é provável que a diminuição na intensidade do sinal analítico do Cd^{2+} seja reflexo, principalmente da presença do oxigênio, o que permite supor, assim como Dinu (2015), que a capacidade de coordenação de íons Cd^{2+} ao AH seja favorecida pela sua interação com grupos carboxílicos ($\text{O}^{\text{X-}}:\text{M}^{\text{X+}}$) e em menor grau, por nitrogênio e enxofre [133,134]. Estudos anteriores revelam que o grupo funcional carboxilato é o que mais contribui para a interação Cd^{2+} -AH (Figura 17) [131,135].

Figura 17. Mecanismo de interação entre o AH e o cádmio.



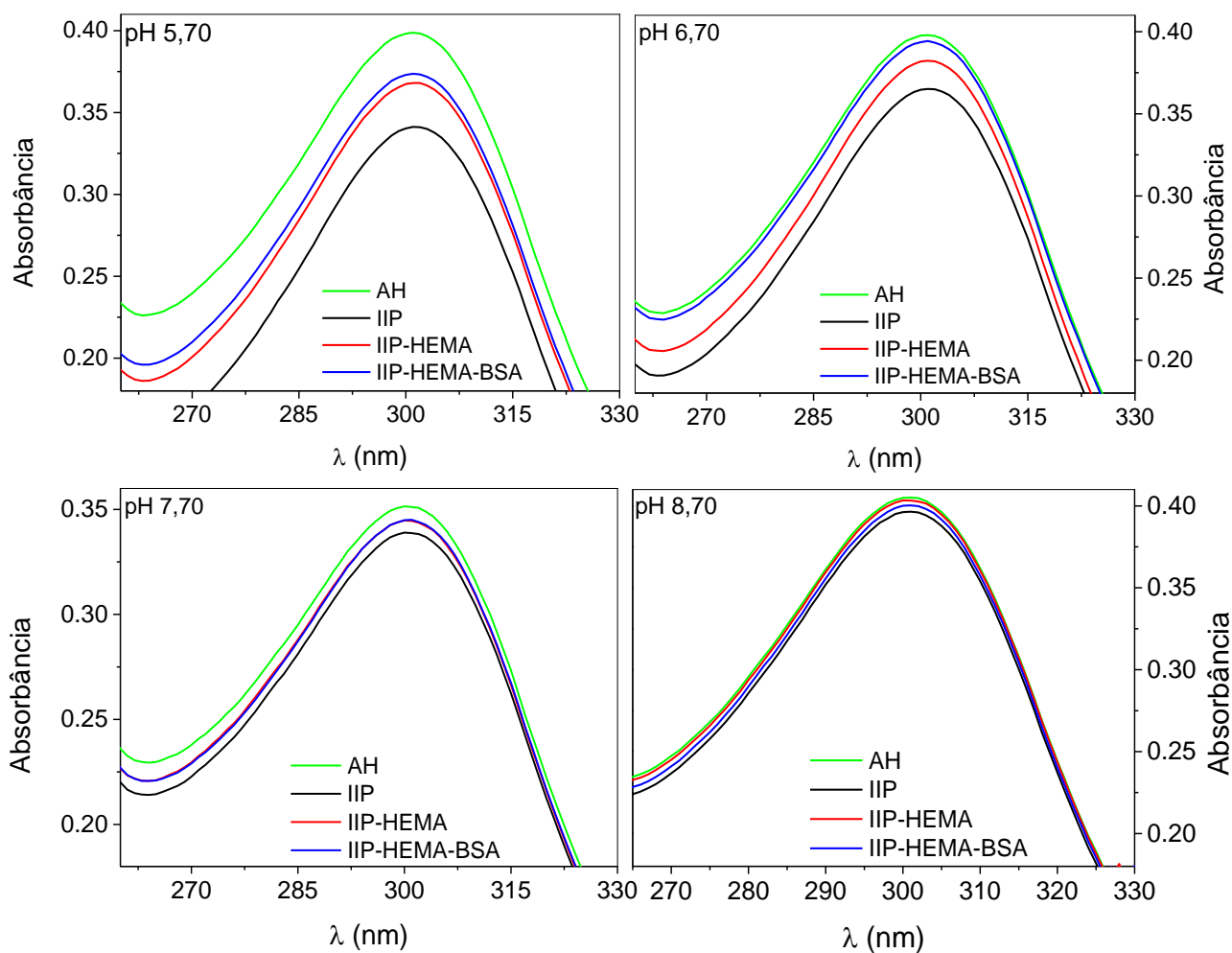
É conveniente destacar que a intensidade do sinal obtido para o IIP é ligeiramente maior do que para o IIP-HEMA e o IIP- HEMA-BSA, o que pode ser mais uma vez atribuído à eficiência dos modificadores químicos. Além disso, os

perfis de sorção de Cd^{2+} mostram que o comportamento dos polímeros IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA é similar na ausência ou presença de diferentes concentrações de AH. De acordo com os resultados os polímeros quimicamente modificados apresentam potencial para a extração/pré-concentração de cádmio e simultânea exclusão de macromoléculas, mesmo na presença de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Esses resultados são satisfatórios, uma vez que a concentração das substâncias húmicas em amostras de água naturais tem sido encontradas na faixa de $1,0\text{-}6,0 \text{ mg L}^{-1}$ [135,136].

A fim de confirmar a capacidade de exclusão, soluções de Cd^{2+} na presença de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas em diferentes pHs (5,70-8,70), percoladas pelos polímeros e o efluente recolhido, foi monitorado em toda região do ultravioleta (UV). Como mostra a Figura 18, o deslocamento do comprimento de máxima absorção para regiões acima de 270 nm obtidas para os espectros ($\lambda_{\text{max}} > 300 \text{ nm}$) sugerem a existência de grupos aromáticos mais condensados, elevando o grau de humificação da substância utilizada [137,138]. Essa característica é um importante fator na disponibilidade de grupos funcionais para o transporte e complexação de íons metálicos e isso, reflete sobre a capacidade de sorção e interação da substância húmica sobre a superfície dos polímeros [139].

Note que o aumento do pH tem papel fundamental na capacidade de exclusão da substância húmica e que os polímeros quimicamente modificados foram mais eficientes na exclusão de AH em toda a faixa de pH avaliado.

Figura 18. Espectros de absorção molecular na região do UV obtidos para o efluente IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA. Condições: solução de Cd^{2+} $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ na presença de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtidas em pH 5,70, 6,70, 7,70, 8,80.



Sob condição ácida (pH próximo ao p_{cz}), a eficiência de exclusão dos três polímeros é baixa e a superfície, menos carregada negativamente, é insuficiente para excluir as macromoléculas do meio. Nesse caso, a capacidade de exclusão é de 85,5, 92,2 e 93,7% para o IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, respectivamente, e sobe para 91,7, 96,0 e 98,9% em pH 6,70. Conforme o meio se torna mais alcalino (pH 7,70) a porcentagem de exclusão do AH sobe, e alcança 96,3% para o IIP e 98,0% para os polímeros com acesso restrito. A repulsão eletrostática atinge seu

patamar máximo quando o pH chega a 8,70, onde a capacidade de exclusão atinge 97,0%, 99,5% e 99,0% para os polímeros IIP, IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA, respectivamente.

Sendo assim, a maior capacidade de exclusão dos polímeros com acesso restrito previne as interações não específicas e impede, durante as etapas de extração/pré-concentração, a degradação do sorvente causada pela adsorção da macromolécula na superfície. Portanto, o pH 8,7 foi fixado como a melhor condição, na qual o mecanismo de atração de cádmio e simultânea repulsão eletrostática de AH ocorre predominantemente.

4.6. Efeito dos modificadores HEMA e BSA na seletividade do polímero IIP

Considerando a maior eficiência dos polímeros quimicamente modificados na exclusão de AH em comparação ao IIP, estudos de seletividade foram realizados em relação aos seus respectivos polímeros não impressos (NIP, NIP-HEMA e NIP-HEMA-BSA) para avaliar se os modificadores HEMA e BSA influenciam na capacidade de retenção seletiva de Cd^{2+} na presença de íons concomitantes. A seletividade dos sítios de impressão criados durante a formação da rede polimérica foi comparada por meio dos coeficientes de distribuição (K_d), seletividade (k) e seletividade relativo (k') após a sorção competitiva dos íons Cd^{2+} na presença de Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} . Os íons Pb^{2+} (132,0 pm), Zn^{2+} (88,0 pm), Cu^{2+} (87,0 pm), Ni^{2+} (83,0 pm) e Co^{2+} (83,8 pm) foram escolhidos por possuírem a mesma carga e raio iônico relativamente próximo ao do analito (109,0 pm) [140].

Como mostra a Tabela 5, exceção feita aos íons Pb^{2+} (forte competidor) os valores de k' superiores a uma unidade ($k' \geq 1,0$), indicam que o IIP e o IIP-HEMA apresentam seletividade para íons Cd^{2+} quando comparados aos seus respectivos

polímeros não impressos, NIP e NIP-HEMA, mesmo na presença dos íons competidores.

Table 5. Parâmetros de seletividade para a sorção competitiva de $\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$, $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, $\text{Cd}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$, $\text{Cd}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ e $\text{Cd}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ sobre a superfície dos polímeros com e sem impressão química.

| Polímero | K_d | | K | k' |
|----------|------------------|------------------|-------|-------|
| | Cd^{2+} | Pb^{2+} | | |
| IIP | 128,46 | 322,79 | 0,40 | 0,14 |
| NIP | 106,52 | 36,12 | 2,95 | |
| IIP-HEMA | 23,86 | 528,90 | 0,05 | |
| NIP-HEMA | 50,66 | 460,42 | 0,11 | |
| Polímero | Cd^{2+} | Zn^{2+} | K | k' |
| | Cd^{2+} | Zn^{2+} | | |
| IIP | 116,28 | 149,43 | 0,78 | 13,30 |
| NIP | 3,96 | 67,89 | 0,06 | |
| IIP-HEMA | 86,76 | 1,28 | 67,76 | |
| NIP-HEMA | 118,20 | 19,93 | 5,93 | |
| Polímero | Cd^{2+} | Cu^{2+} | K | k' |
| | Cd^{2+} | Cu^{2+} | | |
| IIP | 68,52 | 87,90 | 0,78 | 5,22 |
| NIP | 13,41 | 89,70 | 0,15 | |
| IIP-HEMA | 57,32 | 713,66 | 0,08 | |
| NIP-HEMA | 8,07 | 275,04 | 0,03 | |
| Polímero | Cd^{2+} | Ni^{2+} | K | k' |
| | Cd^{2+} | Ni^{2+} | | |
| IIP | 84,84 | 395,03 | 0,22 | 2,51 |
| NIP | 26,55 | 310,57 | 0,09 | |
| IIP-HEMA | 89,30 | 40,44 | 2,21 | |
| NIP-HEMA | 17,71 | 40,37 | 0,43 | |
| Polímero | Cd^{2+} | Co^{2+} | K | k' |
| | Cd^{2+} | Co^{2+} | | |
| IIP | 43,19 | 151,15 | 0,29 | 3,02 |
| NIP | 37,86 | 399,86 | 0,10 | |
| IIP-HEMA | 183,17 | 27,30 | 6,71 | |
| NIP-HEMA | 57,84 | 27,09 | 2,14 | |

K_d : Coeficiente de distribuição; k: Coeficiente de seletividade; k' : Coeficiente de seletividade relativo

O aumento significativo do fator de impressão observado para Cd^{2+} em relação aos íons de menor raio iônico (83,0-88,0 pm) é atribuída à geometria de coordenação e tamanho da cavidade de impressão criada durante a síntese do

polímero. Este resultado demonstra de forma convincente que o uso do HEMA como comonômero na síntese não influenciou na seletividade do polímero IIP.

Por outro lado, a maior adsorção de íons Pb^{2+} pode ser explicada pelo maior raio iônico dos íons (próximo à dos íons Cd^{2+}). Provavelmente, a geometria de hidratação de espécies polinucleares, assim como, $Pb_2OH_3^+$, $Pb_3(OH)_4^{2+}$, $Pb_4(OH)_4^{4+}$ e $Pb_6(OH)_8^{4+}$ formadas em pH 8,70 se encaixem perfeitamente à conformação espacial deixada pelo efeito de memória da cavidade seletiva do Cd^{2+} [86,141]. Além disso, o grau de seletividade depende também da maior ou menor afinidade do metal pelos grupos funcionais da rede polimérica. Em acordo com a teoria dos ácidos e bases duros e moles (HSAB), o átomo de enxofre, como base mole, é a chave para a seletividade do Cd^{2+} observada na presença dos íons Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} . A Tabela 6 mostra a classificação de ácidos e bases duros e moles.

Tabela 6. Classificação de ácidos e bases moles e duros

| Classificação | EN | P | Oxidável | Par de elétrons |
|---------------|----|---|---------------------|--|
| Base mole | ↓ | ↑ | Facilmente oxidável | Não ligado |
| Base dura | ↑ | ↓ | Não oxidável | muito ligado |
| Ácido mole | ↓ | ↑ | DC+ ↓ | orbitais p ou d (átomo central grande) |
| Ácido dura | ↑ | ↓ | DC+ ↑ | não tem par de elétron (átomo central pequeno) |

EN: Eletronegatividade; P: Polarizabilidade; DC+: densidade de carga positiva

Dessa maneira, a tendência do metal em aceitar elétrons durante a coordenação (moleza do metal) define a estabilidade do complexo e a seletividade do polímero na presença de íons semelhantes. Sendo assim, é possível prever a estabilidade da ligação entre o íon Cd^{2+} e os segmentos de poli(aliltiouréia) da

estrutura polimérica. Portanto, baseada na moleza do metal e em conformidade com o raio iônico, baixa carga e eletronegatividade, a ordem de estabilidade dos íons $Pb^{2+} > Cd^{2+}$ é superior à dos íons Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} e, portanto fortemente polarizáveis para serem usados como template para a ATU [110,142].

No que diz respeito à seletividade do polímero IIP-HEMA-BSA, foram observados valores de k' inferiores a uma unidade (Tabela 5). O enxerto da camada da BSA espacialmente distribuída sobre a superfície IIP-HEMA diminuiu substancialmente a seletividade do polímero. Provavelmente, as multicamadas de proteína expõem mais grupos doadores de elétrons, principalmente na forma de aminoácidos com base em Histidina, Triptofano e Tirosina com resíduos de grupos tiol, amino e carboxílicos, além de cadeias laterais cíclicas contendo grupos hidroxila, aumentando a afinidade de sorção para os diversos íons do meio [124].

Em resumo, o polímero IIP-HEMA apresentou seletividade suficiente e relativamente alta em relação ao Cd^{2+} do que o polímero não impresso. Além disso, foi provado que o comonômero hidrofílico HEMA pode ser usado efetivamente como acesso restrito na modificação química do polímero IIP para a separação de ácido húmico e pré-concentração do íon Cd^{2+} na presença de íons competitivos sem perder a seletividade. Ademais, a partir dos resultados de sorção de Cd^{2+} e de acordo com o desempenho dos polímeros IIP-HEMA e IIP-HEMA-BSA na exclusão de AH e do efeito do ancoramento da BSA sobre a seletividade, o polímero com acesso restrito IIP-HEMA foi escolhido como material para o desenvolvimento de um método analítico para a aplicação e determinação de Cd^{2+} em diferentes amostras de água, assim como em amostras de alimento (linhaça), fitoterápicos (*Ginkgo biloba*) e cigarro.

4.7. Otimização do procedimento de pré-concentração utilizando o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

Os níveis codificados e decodificados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} realizado para as variáveis independentes, tipo de eluente, concentração do eluente (mol L^{-1}), massa de adsorvente (mg), vazão de pré-concentração (mL min^{-1}) e concentração do tampão (mol L^{-1}) e as réplicas de cada resposta das variáveis resposta ($n=2$), intensidade de sinal (Abs) e eficiência de sensibilidade (ES) são mostrados na Tabela 7.

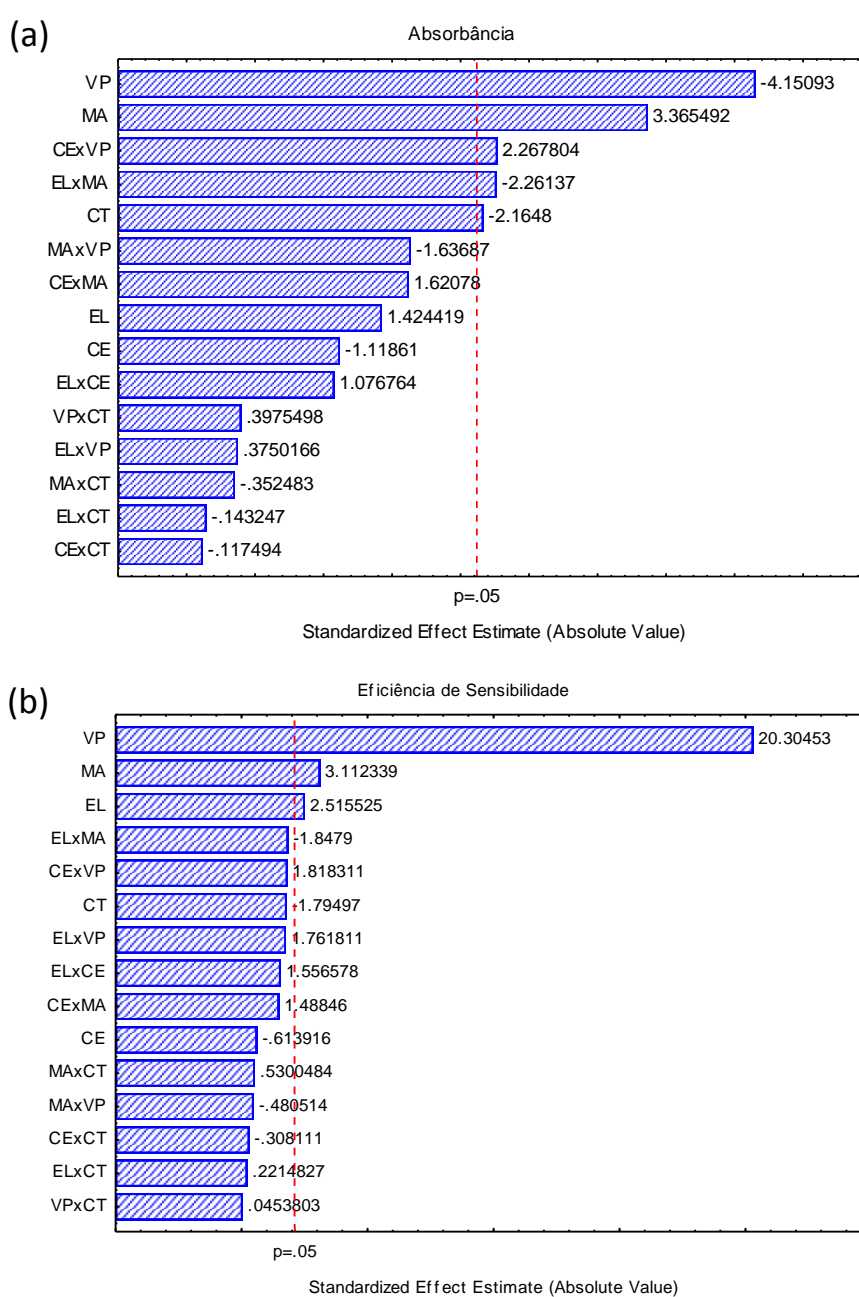
Tabela 7. Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} utilizado na otimização para a pré-concentração de Cd^{2+} utilizando o Sistema FIA-FAAS.

| Fator | Níveis | | | | | | | | |
|---|--------------|----------------|----|----|----|-------|----------------------|-------|-------|
| | Inferior (-) | Superior (+) | | | | | | | |
| EL | HCl | HNO_3 | | | | | | | |
| EC (mol L^{-1}) | 1,0 | 2,0 | | | | | | | |
| AM (mg) | 50,0 | 100,0 | | | | | | | |
| FR (mL min^{-1}) | 3,5 | 7,5 | | | | | | | |
| BC (mol L^{-1}) ^a | 0,01 | 0,10 | | | | | | | |
| Ensaio | EL | CE | MA | VP | CT | Abs | ES ($\times 10^4$) | | |
| 13 | - | - | + | + | + | 0,099 | 0,116 | 6,169 | 7,269 |
| 9 | - | - | - | + | - | 0,112 | 0,096 | 7,025 | 5,994 |
| 7 | - | + | + | - | + | 0,124 | 0,131 | 3,603 | 3,813 |
| 11 | - | + | - | + | + | 0,093 | 0,094 | 5,788 | 5,863 |
| 5 | - | - | + | - | - | 0,143 | 0,155 | 4,160 | 4,528 |
| 1 | - | - | - | - | + | 0,117 | 0,120 | 3,396 | 3,493 |
| 12 | + | + | - | + | - | 0,124 | 0,114 | 7,769 | 7,119 |
| 8 | + | + | + | - | - | 0,137 | 0,140 | 4,003 | 4,070 |
| 3 | - | + | - | - | - | 0,110 | 0,095 | 3,201 | 2,778 |
| 4 | + | + | - | - | + | 0,086 | 0,135 | 2,498 | 3,947 |
| 6 | + | - | + | - | + | 0,126 | 0,133 | 3,662 | 3,875 |
| 2 | + | - | - | - | - | 0,130 | 0,140 | 3,787 | 4,082 |
| 16 | + | + | + | + | + | 0,115 | 0,116 | 7,206 | 7,819 |
| 15 | - | + | + | + | - | 0,118 | 0,125 | 7,400 | 6,850 |
| 10 | + | - | - | + | + | 0,115 | 0,107 | 7,163 | 6,675 |
| 14 | + | - | + | + | - | 0,109 | 0,110 | 6,813 | 7,188 |

^a tampão Tris-HCl pH 8,7 ; EL: Eluente, CE: Concentração do Eluente, MA: Massa de adsorvente, VP: Vazão de Pré-concentração, CT: Concentração de Tampão.

O diagrama de Pareto mostra a distribuição dos efeitos calculados para o modelo linear. A análise dos efeitos principais, de interação e o grau de significância estimado para a (a) intensidade do sinal analítico e (b) eficiência de sensibilidade são apresentados abaixo (Figura 19).

Figura 19. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na pré-concentração de cádmio usando como resposta (a) Abs e (b) ES.



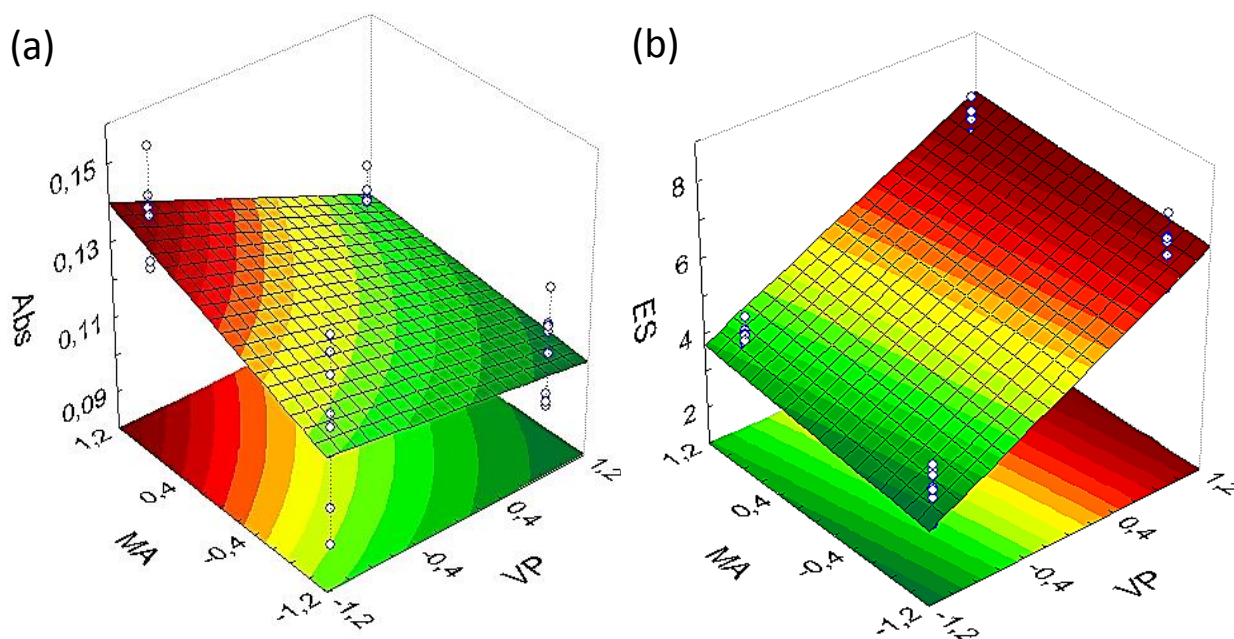
Como observado no diagrama de Pareto, para ambos os casos o parâmetro mais significativo é a VP seguido pela MA. Note que, exceção feita aos fatores de interação dois a dois CE x VP e EL x MA (Abs) e o efeito principal EL (ES) para $t_{cal} < t_{tab}$, todos os outros efeitos calculados, sejam eles principais ou de interação não são estatisticamente significativos ao nível de 95,0% de confiança ($p < 0,05$). Parece que o principal fator no processo de extração/pré-concentração de cádmio, é a vazão de pré-concentração. A massa de adsorvente, apesar de menos significativa, parece atuar no sentido de maximizar a resposta. Outros dois parâmetros de interação têm efeito significativo para a Abs, e estão associados à VP e MA. A combinação das variáveis CE x VP em níveis iguais (- -) e de EL x MA em níveis diferentes (- +), parecem atuar no sentido de aumentar a resposta.

Para visualizar a representatividade dos efeitos calculados a Figura 20 apresenta o gráfico de probabilidade (efeitos *versus* o valor de z) para a variável dependente (a) Abs e (b) ES [143].

O deslocamento conjunto dos efeitos de primeira ordem do nível inferior (-) para o nível superior (+) da variável MA e de mudança do nível superior (+) para o nível inferior da VP representam 53,2% da intensidade do sinal (Abs) (Figura 16 a). Em caso de mudança da variável resposta, em média, o deslocamento do nível inferior ($3,5 \text{ mL min}^{-1}$) para o superior ($7,5 \text{ mL min}^{-1}$) da VP representa um aumento de 3,2 unidades na ES. Nesse caso, o parâmetro MA fica menos evidente, sua representatividade cai de 21,1 % para 2,2% e a VP passa a ser a etapa dominante na estratégia de escolha do planejamento, com um aumento médio de 92,2% na ES. O conjunto de efeitos restantes, seja ele principal ou de interação, passa a contribuir com apenas 7,8% somados (Figura 16 b).

Observe que a simples mudança da variável dependente (resposta) Abs para a ES ocorre com predomínio da VP e inversão do seu sentido de deslocamento. Assim, o caminho de máxima ascensão sugere o deslocamento da variável Abs para o nível superior. A Figura 21 mostra a inversão do sentido de deslocamento na superfície de resposta com a mudança da variável dependente Abs para ES.

Figura 21. Superfície de Resposta do efeito de interação VP x MA para a mudança da variável resposta (a) Abs para (b) ES.



De acordo com a superfície obtida para a absorvância, há um forte indicativo de que a cinética de sorção de íons Cd^{2+} na superfície do polímero IIP-HEMA é lenta. Isso implica em deslocamento da variável para vazões menores dentro do domínio avaliado ($3,5 - 7,5 \text{ mL min}^{-1}$), o que resulta em maiores intensidades de sinal atribuído ao maior tempo de contato entre a superfície do polímero e amostra. Por outro lado, a inversão de sentido de deslocamento na superfície obtida para a ES indica a influência do novo fator implícito no planejamento, o tempo de amostragem.

Nesse caso, de acordo com a tendência do planejamento, maiores absorvâncias pendem ao nível inferior da variável VP e, portanto maior tempo de pré-concentração (5,71 min), enquanto que a razão entre as menores intensidades de sinal e tempo de pré-concentração (2,67 min) são contrabalanceadas. Assim, a frequência analítica do método passa a ser explícita no planejamento e o efeito da variável VP, agora mais pronunciada, é deslocado para o sentido positivo da superfície.

Para decidir qual o parâmetro melhor se adequa aos dados experimentais, a qualidade do ajuste dos modelos para as variáveis Abs e ES foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA). O desvio das respostas e das estimativas feitas pelo modelo em torno da média pode ser decomposta na Equação 12:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_{res} \quad 12$$

Em que SQ_T é a soma quadrática total, SQ_R é a soma quadrática explicada pelo modelo e SQ_{res} é a soma dos quadrados devido ao resíduo. A Tabela 8 fornece um resumo da ANOVA obtida para a intensidade de sinal analítico, absorvância e do parâmetro eficiência de sensibilidade, ambas obtidas por meio da modelagem linear.

Tabela 8. Comparação entre as análises de variância dos modelos lineares para a Abs e ES.

| Variável Dependente | Parâmetro | SQ ^a | GL ^b | MQ ^c | F _{cal} | F _{tab(15,16)} (95%) |
|-------------------------------------|---|----------------------|-----------------|----------------------|------------------|-------------------------------|
| Absorbância (Abs) | SQ _R ^d | 6,5x10 ⁻³ | 15 | 4,3x10 ⁻⁴ | | |
| | SQ _{res} ^e | 1,9x10 ⁻³ | 16 | 1,2x10 ⁻⁴ | | |
| | SQ _T ^f | 8,4x10 ⁻³ | 31 | 2,7x10 ⁻⁴ | 3,58 | 2,35 |
| | Varição explicada (R ²) | 0,774 | R | 0,877 | | |
| | R ² ajustado (R _{aj} ²) | 0,555 | R _{aj} | 0,745 | | |
| Eficiência de Sensibilidade (ES) | SQ _R | 88,9 | 15 | 5,9 | | |
| | SQ _{res} | 3,2 | 16 | 0,2 | | |
| | SQ _T | 92,0 | 31 | 2,9 | 29,5 | 2,35 |
| | Varição explicada (R ²) | 0,966 | R | 0,983 | | |
| | R ² ajustado (R _{aj} ²) | 0,931 | R _{aj} | 0,965 | | |

^a Soma quadrática; ^b Graus de liberdade; ^c $MQ = SQ/GL$; ^d $SQ_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$; ^e $SQ_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2$; ^f $SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$

O coeficiente de determinação (R^2), obtido a partir da equação 13, indica o quanto da variação da resposta em torno da média é explicado pelo modelo.

$$R_{ES}^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{88,9}{92,0} = 0,966 \text{ e } R_{Abs}^2 = \frac{6,5 \times 10^{-3}}{8,4 \times 10^{-3}} = 0,774 \quad \text{Equação 13}$$

Isso significa que para a Abs, 77,4% da variação em torno do planejamento são explicadas pelo modelo de regressão linear, para os resíduos restam 22,6%. Quando o tempo de amostragem é considerado, o grau de correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo sobe para 96,6%, enquanto a variação explicada pelo resíduo cai de 22,6% para 3,4%. O valor de R_{aj}^2 , dado pela Equação 14, explica não apenas o quanto da variação é explicado pelo modelo, como também considera o número de fatores do planejamento.

$$R_{ajAbs}^2 = 1 - \left(\frac{SQ_{res}/n - p}{SQ_T/n - 1} \right) = 0,555 \text{ e } R_{ajES}^2 = 1 - \frac{0,2}{2,9} = 0,931 \quad \text{Equação 14}$$

Em que n é o número de experimentos e p , o número de coeficientes do modelo. Podemos testar a hipótese nula, $H_0: \beta = 0$, isto é, quando não há relação linear entre as variáveis, de acordo com a Equação 15.

$$F_{calAbs} = \frac{(SQ_R/p - 1)}{(SQ_{res}/n - p)} = 3,58 \text{ e } F_{calES} = \frac{5,9}{0,2} = 29,5 \quad \text{Equação 15}$$

De acordo com a tomada de decisão, para os dois casos $F_{calAbs,ES} > F_{tab(15,16)}$, ao nível de 95% de confiança e portanto, devemos descartar a

possibilidade de $\beta = 0$; existe relação linear entre as variáveis. Nem sempre, uma regressão dada como significativa é útil para realizar previsões. Observe que apesar de $F_{cal_{Abs}}(3,58) > F_{tab}(2,35)$, a proximidade dos valores de F indicam que a faixa de variação coberta pelos fatores estudados é estreita, fazendo com que o efeito sobre as respostas fique mascarado pela extensão do erro experimental.

Por outro lado, a inserção do tempo de amostragem, evidencia a extensão dos efeitos das variáveis e o valor de $F_{cal_{ES}}(29,5)$ passa a ser dez vezes maior que o valor da distribuição F_{tab} indicando que o modelo de regressão obtido para a eficiência de sensibilidade é muito mais consistente. Dessa forma, a quantidade de informação modelada pelo coeficiente de regressão que a ES explica em relação ao modelo previsto é muito maior do que aquelas observadas para a variável dependente Abs.

Portanto, com o objetivo de obter sensibilidade, maior frequência de amostragem e levando em consideração o melhor ajuste com menor erro e melhor correlação, o parâmetro ES foi escolhido para a avaliação do método. Assim, de acordo com os valores preditos para o planejamento fatorial 2^{5-1} , as variáveis independentes menos representativas, relacionadas à etapa de eluição EL, CE e MA foram fixadas no nível superior, HNO_3 a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ com $100,0 \text{ mg}$ de adsorvente, enquanto que a CT em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (nível inferior). Para a variável VP, apesar do efeito representativo, a região experimental não pode ser deslocada para níveis superiores da superfície de resposta devido às limitações instrumentais. O aumento da vazão ocasionou o aumento na pressão interna da coluna no sistema FIA-FAAS e vazamentos foram observados. Portanto, a melhor condição foi estabelecida para o nível superior do domínio avaliado ($7,5 \text{ mL min}^{-1}$).

4.8. Interferentes

Para avaliar o efeito de íons interferentes e determinar a influência de alguns cátions e ânions pré-concentração de Cd^{2+} , soluções binárias contendo $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} e cátions com carga e raio iônico similar foram preparadas em diferentes proporções na ausência e presença de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, analisadas pelo método proposto e investigadas para a aplicação em diferentes matrizes (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito de cátions interferentes na taxa de pré-concentração de Cd^{2+} na presença e ausência de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

| Interferentes | AH (mg L^{-1}) | Proporção (m/m) | | | | |
|------------------|---------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1:10 | 1:20 | 1:30 | 1:50 | 1:100 |
| % Recuperação | | | | | | |
| Cu^{2+} | - | 95,1 | 95,3 | 92,9 | 87,3 | - |
| | 5,0 | - | - | 97,3 | 94,3 | 90,6 |
| Fe^{3+} | - | 97,7 | 95,9 | 94,7 | 85,7 | - |
| | 5,0 | - | - | 95,4 | 102,8 | 113,2 |
| Pb^{2+} | - | 107,6 | 93,7 | 82,6 | - | - |
| | 5,0 | - | - | 104,8 | 103,5 | 84,4 |
| Ni^{2+} | - | 103,9 | 92,8 | 88,7 | - | - |
| | 5,0 | - | - | 97,9 | 104,8 | 89,2 |
| Zn^{2+} | - | 95,2 | 97,1 | 88,3 | - | - |
| | 5,0 | - | - | 93,8 | 96,9 | 85,6 |
| Co^{2+} | - | 99,3 | 100,2 | 101,5 | 89,6 | - |
| | 5,0 | - | - | 96,7 | 103,2 | 91,2 |
| Sr^{2+} | - | 92,2 | 96,4 | 105,7 | 110,9 | - |
| | 5,0 | - | - | 92,9 | 94,8 | 87,7 |
| V^{5+} | - | 98,9 | 99,7 | 103,3 | 111,4 | - |
| | 5,0 | - | - | 97,0 | 107,5 | 114,2 |
| Ca^{2+} | - | 104,2 | 102,4 | 105,0 | 90,0 | - |
| | 5,0 | - | - | 94,0 | 105,1 | 113,6 |
| Mg^{2+} | - | 94,3 | 99,5 | 103,6 | 87,8 | - |
| | 5,0 | - | - | 101,2 | 104,4 | 112,3 |

De acordo com os resultados, na ausência do AH não há interferência para concentrações 30 vezes maiores que o Cd^{2+} ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) de Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , V^{5+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} resultando em porcentagens de recuperação de 92,9-105,7%,

enquanto que uma concentração 20 vezes maior de Pb^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} resulta em porcentagens de 92,8-97,1%, indicando que a sorção de Cd^{2+} não é afetada mesmo na presença de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ dos íons interferentes. Acima dessa concentração, na proporção 1:30 (m/m), a interferência no sinal de Cd^{2+} é negativa, obtendo recuperações na faixa de 82,6-88,7%. Nesse caso, Pb^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} diminuem a intensidade do sinal analítico devido à maior competição pelos sítios de ligação do IIP-HEMA.

A influência da matéria orgânica dissolvida também foi avaliada. Na presença do AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ o efeito de interferência é reduzido e os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , V^{5+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} podem ser submetidos a pré-concentração usando proporções 1:50 (m/m). Assim, a presença de centros mais duros contendo oxigênio (grupos carboxílicos e fenólicos) da matéria orgânica com afinidade por Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} e Fe^{3+} e centros moles (nitrogênio e enxofre) que competem pelos metais moles como o Pb^{2+} e de fronteira como Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} facilitam a retenção do Cd^{2+} pelos sítios de impressão obtendo recuperações na faixa de 94,3-107,5%.

Além desses resultados, soluções binárias contendo Cd^{2+} e ânions coexistentes também foram submetidos a pré-concentração usando proporções de analito:interferente 1:500 (m/m) para F^- , Cl^- e Br^- e 1:5000 (m/m) para CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} e NO_3^- (Tabela10).

Tabela 10. Efeito de ânions interferentes na pré-concentração de Cd^{2+} na ausência e presença de AH $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

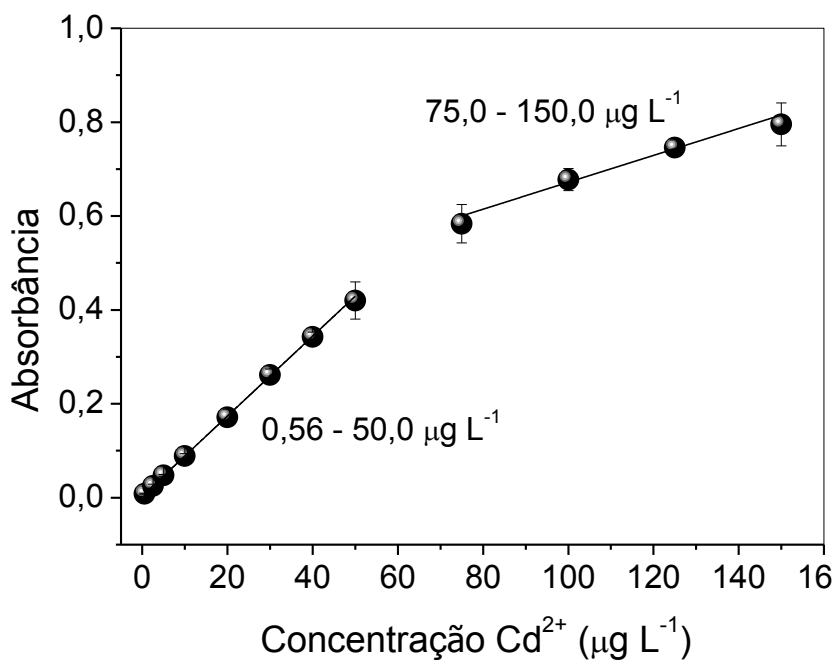
| Interferentes | AH (mg L^{-1}) | Proporção (m/m) | |
|--------------------|---------------------------|-----------------|--------|
| | | 1:500 | 1:5000 |
| | | % Recuperação | |
| CO_3^{2-} | - | - | 102,0 |
| | 5,0 | - | 98,5 |
| HCO_3^- | - | - | 100,6 |
| | 5,0 | - | 99,2 |
| SO_4^{2-} | - | - | 106,8 |
| | 5,0 | - | 97,9 |
| NO_3^- | - | - | 93,9 |
| | 5,0 | - | 102,3 |
| Cl^- | - | 94,1 | - |
| | 5,0 | 97,4 | - |
| Br^- | - | 95,9 | - |
| | 5,0 | 98,0 | - |
| F^- | - | 94,4 | - |
| | 5,0 | 93,6 | - |

Valores de recuperação na faixa de 93,6% a 98,0% para os haletos e 93,9% a 106,8% para a presença de carbonatos, sulfatos e nitratos indicam que a sorção de Cd^{2+} na superfície do polímero não é afetada pela presença de ânions mesmo na presença de AH.

4.9. Parâmetros Analíticos

Sob as condições otimizadas, a qualidade do ajuste do modelo da curva analítica foi avaliada para verificar a linearidade do método na faixa de concentração de $2,5\text{-}150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} . Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as equações 8 e 9 e o valor de LOQ ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$), averiguado experimentalmente, foi inserido na equação de regressão linear e por meio da aplicação da ANOVA o novo ajuste do modelo foi verificado. A Figura 22 mostra as regiões de linearidade obtidas para a determinação de Cd^{2+} .

Figura 22. Avaliação da linearidade do método de extração/pré-concentração de Cd^{2+} .



O modelo foi estatisticamente avaliado por meio da análise de variância aplicando a *one-way* ANOVA. O resumo da análise de variância do modelo de regressão é apresentado na Tabela 11. Ao nível de 95% de confiança, a razão entre as variâncias das somas quadráticas explicadas pelo modelo (SQ_R) e residual (SQ_{res}), para um $F_{cal} \gg \gg F_{tab}$, revelam que o modelo linear parece mesmo o mais indicado para descrever a variação da absorbância em relação à concentração de Cd^{2+} para uma faixa de concentração linear de $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ a $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 11. Análise de variância para o ajuste do modelo de regressão linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a relação absorvância e concentração de Cd^{2+} .

| Fonte de Variação | SQ ^a | GL ^b | MQ ^c | F _{cal} | F _{tab} (95%) |
|--|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|--------------------------|
| Regressão (SQ _R) ^d | 0,5079 | 1 | 0,5079 | 31875 | 4,30 F _(1,22) |
| Resíduo (SQ _{res}) ^e | 3,47x10 ⁻⁴ | 22 | 1,60x10 ⁻⁵ | | |
| Falta de ajuste (SQ _{faj}) ^f | 1,62x10 ⁻⁴ | 6 | 2,70x10 ⁻⁵ | 2,25 | 2,74 F _(6,16) |
| Erro puro (SQ _{ep}) ^g | 1,85x10 ⁻⁴ | 16 | 1,20x10 ⁻⁵ | | |
| Total (SQ _T) ^h | 0,5083 | 23 | 2,21x10 ⁻² | | |
| Variação explicada (R ²) ⁱ | 0,9993 | R | 0,9997 | | |
| Máxima variação explicável (R _{máx} ²) ^j | 0,9996 | R _{máx} | 0,9998 | | |
| R ² ajustado (R _{aj} ²) ^k | 0,9993 | R _{aj} | 0,9996 | | |

^aSoma quadrática; ^bGraus de liberdade; ^cValor médio quadrático; ^d $SQ_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$; ^e $SQ_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2$; ^f $SQ_{faj} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$; ^g $SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$; ^h $SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$; ⁱ $R^2 = SQ_R/SQ_T$; ^j $R_{máx}^2 = (SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$; ^k $R_{aj}^2 = [1 - (MQ_{res}/MQ_T)]$

De acordo com a equação 6, o valor do coeficiente de correlação $R = 0,9997$ para $Abs = 0,00851[Cd^{2+}] + 0,00387$ mostra que os desvios dos valores previstos pelo modelo são semelhantes aos desvios dos valores observados (ambos em relação à média global). Isso significa que 99,93% da variação total das observações em torno da média global são explicados pela regressão. A parte da variação das respostas em torno da média que o modelo não consegue reproduzir, a SQ_{res} , ficam com apenas 0,07%.

Podemos obter o erro médio (quadrático) aproximado que cometemos se usarmos a equação de regressão linear para prever a estimativa de cada resposta correspondente à concentração de Cd^{2+} . Admitindo a homoscedasticidade das respostas observadas, na qual a variância dos erros (s^2) em torno da regressão é constante ao longo da faixa avaliada, podemos tomar s^2 como uma boa estimativa da variância residual (σ^2). Assim, a estimativa da variância dos pontos em torno da equação de regressão para o modelo pode ser dada pela equação 16:

$$s^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p} = \frac{3,47 \times 10^{-4}}{22} = 1,60 \times 10^{-5} \quad \text{Equação 16}$$

No qual o termo y_i e \hat{y}_i , é a diferença entre os valores observados e suas estimativas, respectivamente, obtidas de acordo com o ajuste dos mínimos quadrados do modelo. Assim a estimativa do erro padrão da inclinação da curva analítica (b_1) pode ser obtida conforme a equação 17:

$$\text{erro padrão de } b_1 = \frac{s}{\sqrt{S_{xx}}} \text{ onde } S_{xx} = \sum (x_i - \hat{x})^2 \quad \text{Equação 17}$$

Admitindo que os erros se distribuam normalmente, podemos usar a distribuição de *Student* (t_{stu}) para testar a significância do valor estimado para a inclinação b_1 e ter uma relação confiável entre as variáveis, absorvância e concentração (Equação 18):

$$IC = b_1 \pm t_{(0,025,n-p)} \times (\text{erro padrão de } b_1) \quad \text{Equação 18}$$

Como a estimativa do erro $s = 4,0 \times 10^{-3}$ podemos concluir que o limite para a significância do coeficiente angular da equação de regressão é $IC = 8,10 \times 10^{-3} \pm (t_{(0,025,22)} \times 8,15 \times 10^{-5}) = 1,69 \times 10^{-4}$ ao nível de 95% de confiança. Assim, o $IC = 8,10 \times 10^{-3} \pm 1,69 \times 10^{-4}$ não contempla o zero, confirmando a existência de uma relação linear entre as absorvâncias e as concentrações de Cd^{2+} . Da mesma forma podemos testar o intercepto (b_0) da equação de regressão da curva, de acordo com as equações 19 e 20:

$$\text{erro padrão de } b_0 = s \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{nS_{xx}}} \quad \text{Equação 19}$$

$$IC = b_0 \pm t_{(0,025,n-p)} \times (\text{erro padrão de } b_0) \quad \text{Equação 20}$$

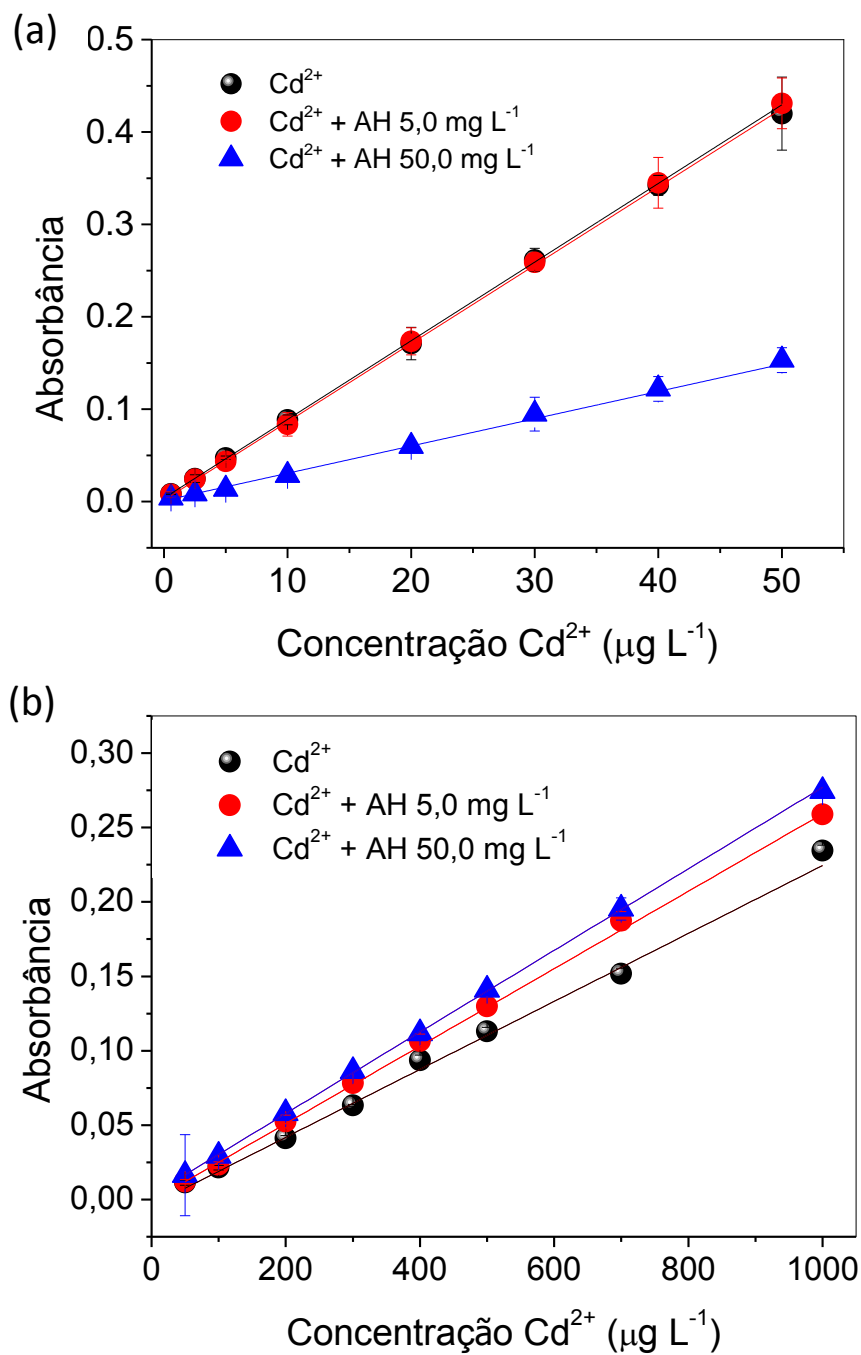
Como $IC = 3,87 \times 10^{-3} \pm t_{(0,025,22)} \times 1,24 \times 10^{-3} = (1,30 \times 10^{-3}, 6,44 \times 10^{-3})$, logo b_0 e b_1 são estatisticamente significativos, e portanto existe evidência suficiente de que o modelo $Abs = b_1[Cd^{2+}] + b_0$ é consistente.

Agora podemos avaliar a qualidade do ajuste do modelo por meio da decomposição do resíduo SQ_{res} em termos das somas quadráticas devido ao erro puro (SQ_{ep}) e a falta de ajuste (SQ_{faj}) para demonstrar a capacidade real do modelo em se ajustar aos dados experimentais. Se compararmos a razão entre MQ_{faj} e MQ_{ep} (Equação 7), temos que $F_{cal}(2,25) < F_{tab}(2,75)$ para $F_{(6,16)}$ graus de liberdade e p-valor (0,083) $>$ 0,05 ao nível de 95% de confiança. Estes valores revelam a impossibilidade dos resultados ocorrerem ao acaso, indicando uma forte relação entre as variáveis. Portanto, não há falta de ajuste para a regressão linear e podemos afirmar com certeza que o modelo é consistente para prever a concentração de Cd^{2+} na faixa de concentração que vai de $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ a $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Acima de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (adicionando o ponto de $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$), o valor da razão entre o MQ_R e o MQ_{res} cai para 5909. Comparado com $F_{(1,25)} = 4,24$, temos ainda que $F_{cal} \gg F_{tab}$, indicando uma regressão significativa, se não fosse pela evidência da falta de ajuste, confirmada pelo alto valor da razão $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 11,7 > F_{(7,18)} = 2,57$. Logo, o modelo de regressão linear deixa de satisfazer a relação entre às variáveis, o que é atribuída a nova região linear de faixa de concentração que vai de $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliar o efeito do ácido húmico sobre o coeficiente angular (*Slope*), b_1 , do modelo, à curva analítica para o Cd^{2+} foi construída na presença da substância húmica em dois níveis de concentração, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. As soluções foram submetidas à etapa de extração/pré-concentração e simultânea exclusão de AH e as novas curvas obtidas foram comparadas por meio da ANOVA para verificar o grau de significância das inclinações obtidas na ausência e presença da substância húmica. Para demonstrar a sensibilidade do método, curvas analíticas também foram construídas sem a etapa de pré-concentração nas mesmas condições acima (ausência e presença do AH), exceção feita à faixa de concentração de Cd^{2+} ($50,0$ - $1000,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). As Figuras 23 apresentam as curvas (a) com e (b) sem a etapa de pré-concentração, respectivamente, obtidas na ausência e presença de AH.

Figura 23. Curvas analíticas obtidas para o IIP-HEMA (a) com (0,56-50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e (b) sem a etapa de pré-concentração (50,0-1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) na ausência e presença de AH 5,0 e 50,0 mg L^{-1} .



As regressões lineares obtidas foram estatisticamente avaliadas pela *one-way* ANOVA. Para todas as curvas, ao nível de 95% de confiança, a razão entre as somas quadráticas explicadas pelo modelo e residual (F_{cal}) foram maiores que seus valores tabelados ($F_{(1,22)}$), indicando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Além disso, os coeficientes de correlação obtidos com a etapa de pré-concentração foram iguais a 0,999 para $Abs(Cd^{2+}) = 0,00851 \pm 0,00005[Cd^{2+}] + 0,00387 \pm 0,00022$ na ausência do AH, enquanto na presença da matéria orgânica o modelo de regressão é pouco modificado e passa a ser $Abs(Cd^{2+}, AH 5,0 mg L^{-1}) = 0,00847 \pm 0,00011[Cd^{2+}] + 0,00360 \pm 0,00061$ para um ajuste de 0,999. Entretanto, o aumento da concentração de AH para $50,0 mg L^{-1}$ diminui a sensibilidade do método (razão entre os *slopes*) em aproximadamente 2,9 vezes. O modelo de regressão linear, agora passa a ser $Abs(Cd^{2+}, AH 50,0 mg L^{-1}) = 0,00295 \pm 0,00006[Cd^{2+}] + 0,00118 \pm 0,00032$ $R = 0,998$ e fica evidente o efeito de matriz atribuído à exclusão da substância húmica complexada ao Cd^{2+} .

As curvas analíticas obtidas sem a etapa de pré-concentração são representadas pelas equações $Abs(Cd^{2+}) = 0,00023 \pm 0,00003[Cd^{2+}] - 0,00387 \pm 0,00102$ ($R = 0,997$), $Abs(Cd^{2+}, AH 5,0 mg L^{-1}) = 0,00026 \pm 0,00001[Cd^{2+}] - 0,00097 \pm 0,00108$ ($R = 0,999$) e $Abs(Cd^{2+}, AH 50,0 mg L^{-1}) = 0,00027 \pm 0,00004[Cd^{2+}] + 0,00293 \pm 0,00145$ ($R = 0,999$) (Figura 18b). Na ausência da minicoluna, limitações instrumentais foram observadas e devido à formação de fuligem causada pela presença de alto teor de matéria orgânica, o que fez com que a intensidade do sinal analítico fosse prejudicada tornando necessária a manutenção do equipamento (queimador) entre as curvas analíticas.

Para a etapa de etapa de extração/pré-concentração, podemos testar a hipótese; se realmente existe diferença significativa entre as médias das inclinações obtidas para os modelos de regressão na ausência e presença da matéria orgânica. A Tabela 12 apresenta as variáveis de entrada (matriz e *slope*) e a análise de variância obtida para as réplicas ($n = 3$) de cada curva analítica.

Tabela 12. Variáveis de entrada e análise de variância para os *slopes* das curvas analíticas obtidas na ausência e presença da substância húmica.

| Variáveis | Matriz | | | ANOVA | | | | | |
|-------------------|------------------|--|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | Cd ²⁺ | Cd ²⁺ + AH 5,0 mg L ⁻¹ | Cd ²⁺ + AH 50,0 mg L ⁻¹ | <i>SQ</i> ^a | <i>GL</i> ^b | <i>MQ</i> ^c | <i>F_{cal}</i> | Valor-p | <i>F_{tab}</i> |
| <i>Slope</i> | 0.00848 | 0.00847 | 0.00313 | 3,87x10 ⁻⁵ | 2 | 1,94x10 ⁻⁵ | 8871,7 | 2,20x10 ⁻⁶ | 9,5 |
| | 0.00853 | 0.00852 | 0.00309 | | | | | | |
| | 0.00852 | 0.00841 | 0.00312 | | | | | | |
| Fonte da Variação | | | | | | | | | |
| Entre os grupos | | | | | | | | | |
| Dentro dos grupos | | | | | | | | | |
| Total | | | | | | | | | |

^aSomas Quadráticas; ^bGraus de Liberdade; ^cValor Médio Quadrático

A partir da diferença entre as variâncias, testamos a significância baseada nos seguintes parâmetros:

- 1) $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$ vs $H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \neq \sigma_3^2$;
- 2) $\alpha = 0,05$;
- 3) $F (n = 3)$;
- 4) Região crítica: $F_{\alpha/2}$;
- 5) $F_{cal} = \frac{MQ_{Entre\ grupos}}{MQ_{Dentro\ dos\ grupos}}$
- 6) Decisão: rejeita-se a hipótese nula (H_0) se $F_{cal} > F_{tab}$.

Deve-se rejeitar a H_0 , $F_{cal} (8871,7) \gg F_{tab} (9,5)$, e podemos concluir que o efeito dos *slopes* na ausência e presença do AH diferem entre si ao nível de significância de 95% e, portanto não existe correlação entre as inclinações, fato confirmado pelo baixo valor-p ($< 0,05$). Podemos aplicar o teste de Tukey HSD (*Honestly Significant Differences*) para realizar as comparações múltiplas e confirmar quais das médias dos grupos de *slopes* diferem significativamente entre si (Tabela 13) [144].

Tabela 13. Teste de Tukey para a comparação entre as médias dos *slopes* das curvas analíticas.

| Matriz ^a | Cd ²⁺ 0,00851 | Cd ²⁺ + AH 5,0 mg L ⁻¹ 0,00847 | Cd ²⁺ + AH 50,0 mg L ⁻¹ 0,00295 |
|---|-----------------------------|---|--|
| Cd ²⁺ | | 0.39 | $2,27 \times 10^{-4}$ |
| Cd ²⁺ + AH 5,0 mg L ⁻¹ | 0.39 | | $2,27 \times 10^{-4}$ |
| Cd ²⁺ + AH 50,0 mg L ⁻¹ | $2,27 \times 10^{-4}$ | $2,27 \times 10^{-4}$ | |

^a Valor-p para todos os pares de médias dos *slopes*

Não existe diferença significativa entre a média dos *slopes* das curvas analíticas na ausência e presença de AH 5,0 mg L⁻¹ (valor-p $> 0,05$). Para as demais médias das inclinações, o tratamento revela a falta de correlação entre as curvas obtidas na ausência e presença de AH 50,0 mg L⁻¹ ou mesmo para ambas as curvas analíticas obtidas com a presença da substância húmica, ao nível de 95% de significância (valor-p $< 0,05$). Isso confirma, mais uma vez que para o método proposto é possível obter sensibilidade adequada mesmo na presença de AH 5,0 mg L⁻¹.

Um resumo dos parâmetros analíticos do método é apresentado na Tabela 14. Os valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), fator de pré-concentração (FP), índice de consumo (IC), eficiência de concentração (EC) e

frequência analítica (FA) foram obtidos de acordo com as equações 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente.

Tabela 14. Parâmetros analíticos para a determinação de Cd^{2+} utilizando o método proposto.

| Parâmetros Analíticos | Valores obtidos | | |
|---------------------------------------|---|---------------------------|----------------|
| Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0,56-50,0 | | |
| Modelo de regressão linear | $Abs = 0,00851[Cd^{2+}] + 0,00387$ | | |
| R | 0,999 | | |
| LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0,56 | | |
| LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0,17 | | |
| FP | 37 | | |
| FA (h^{-1}) ^a | 21 | | |
| IC (mL) | 0,54 | | |
| EC (min^{-1}) | 13,1 | | |
| | Concentração Cd^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) | AH (mg L^{-1}) | DPR (% , n=10) |
| Precisão intra-dia | 2,5 | - | 4,68 |
| | 40,0 | - | 2,32 |
| | 2,5 | 5,0 | 2,41 |
| | 40,0 | 5,0 | 3,69 |
| Precisão inter-dia | 2,5 | - | 0,96 |
| | 40,0 | - | 2,41 |
| | 2,5 | 5,0 | 4,03 |
| | 40,0 | 5,0 | 1,64 |

^aOs resultados foram obtidos considerando um volume de amostra de 20,0 mL e um ciclo de 2,83 min (etapas de pré-concentração e eluição).

O alto FP (34 vezes) mostra o elevado ganho de sensibilidade para o método e o potencial do polímero IIP-HEMA na extração/pré-concentração de Cd^{2+} . Como consequência os baixos valores de LOD e LOQ para uma faixa linear de 0,56-50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ indicando que o método é adequado para a quantificação de Cd^{2+} em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) mesmo na presença de matéria orgânica. A precisão avaliada em termos de repetibilidade intra e inter-dia ($n = 10$) foram adequadas para o método, com um Desvio Padrão Relativo (DPR) menor que 5,0%, obtido em dois

níveis de concentração (2,5 e 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) na ausência e presença de AH 5,0 mg L^{-1} , demonstrando a baixa variação entre as medidas para o método proposto.

Devido à inexistência de polímeros ionicamente impressos- Cd^{2+} com acesso restrito (IIP-RAM), a performance analítica do método proposto foi comparada com métodos desenvolvidos para polímeros IIP- Cd^{2+} previamente reportados na literatura, como mostra a Tabela 15.

Tabela 15. Comparação entre o método proposto e diferentes polímeros impressos para a determinação de Cd^{2+} .

| Monômero | Técnica | Modo | Aplicação | VP ^a | LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | FP ^b | Faixa linear | FA (h^{-1}) ^c | Referência |
|-------------------|---------|----------|--|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------|-------------------------------------|---------------|
| 1-VI ^d | FAAS | On-line | Água e urina | 15,0 | 0,11 | 38,4 | 1,0-50,0 | 22 | [74] |
| 4-VP ^e | FAAS | On-line | Água | 20,0 | 0,11 | 117,0 | 1,0-10,0 | 20 | [145] |
| MA ^f | FAAS | Batelada | Água | 300,0 | 0,29 | 55,5 | 0,3-50,0 | - | [146] |
| DEM ^g | FG AAS | Off-line | Peixe | 25,0 | 0,15 | 12,5 | 0-0,24 | 6 | [147] |
| 2-VP ^h | ICP-OES | Batelada | Água e ervas Medicinais | 20,0 | 0,14 | 20,0 | 1,0-50,0 | - | [148] |
| 4-VP | FAAS | Batelada | Água e alimetos | 150,0 | 0,20 | - | 0,5-150,0 | - | [149] |
| ATU ⁱ | FAAS | On-line | Água, alimento, fitoterápico e cigarro | 20,0 | 0,17 | 37 | 0,56-50,0 | 21 | Este trabalho |

^aVolume de pré-concentração; ^bFator de Pré-concentração; ^cFrequência Analítica; ^d1-vinilimidazol; ^e4-vinilpiridina; ^fÁcido Metacrílico; ^g2-(dietilamino) etilmetacrilato; ^h2-vinilpiridina; ⁱAliltioureia.

O baixo volume de amostra, ampla faixa linear, satisfatório fator de pré-concentração e frequência analítica, além de um baixo limite de detecção são as principais vantagens do método. Além disso, a capacidade de reutilização do polímero IIP-HEMA foi estimada em aproximadamente 726 ciclos (empregado em todos os estudos de sorção, exclusão, otimização, aplicação e validação) que incluem etapas de extração/pré-concentração e exclusão em meio básico (pH 8,70) e eluição ácida (HNO_3 2,0 mol L^{-1}) demonstrando alta estabilidade química sem a perda das propriedades sortivas de íons Cd^{2+} (impressão) provando que a presença

do modificador previne a degradação da superfície do sorvente mesmo na presença de altas concentrações de matéria orgânica.

5. APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido foi aplicado em diferentes amostras de água superficiais (rio e lago) e subterrânea (poço e mineral), como mostra a Tabela 16. A exatidão foi avaliada diretamente nas amostras por meio de testes de adição e recuperação em dois níveis de concentração (2,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) na ausência e presença de AH.

Tabela 16. Teste de adição e recuperação em amostras de água.

| Amostra de água | AH (mg L ⁻¹) | Cd ²⁺ (µg L ⁻¹) | | Recuperação (%) |
|-----------------|--------------------------|--|-------------------------|-----------------|
| | | Adicionado | Encontrado ^a | |
| Rio | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 1,88 ± 0,13 | 93,8 |
| | 5,0 | 2,0 | 1,95 ± 0,23 | 97,5 |
| | - | 20,0 | 20,80 ± 0,85 | 103,9 |
| | 5,0 | 20,0 | 18,90 ± 0,64 | 94,5 |
| Rio | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 1,97 ± 0,12 | 98,5 |
| | 5,0 | 2,0 | 1,84 ± 0,78 | 92,0 |
| | - | 20,0 | 18,80 ± 0,52 | 94,2 |
| | 5,0 | 20,0 | 21,30 ± 0,40 | 106,5 |
| Rio | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 2,17 ± 0,11 | 108,7 |
| | 5,0 | 2,0 | 2,02 ± 0,53 | 101,0 |
| | - | 20,0 | 19,80 ± 0,65 | 99,1 |
| | 5,0 | 20,0 | 20,90 ± 0,28 | 104,5 |
| Rio | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 1,98 ± 0,14 | 98,9 |
| | 5,0 | 2,0 | 2,13 ± 0,71 | 106,5 |
| | - | 20,0 | 19,40 ± 0,80 | 97,2 |
| | 5,0 | 20,0 | 19,80 ± 0,65 | 99,0 |
| Lago | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 1,97 ± 0,34 | 98,7 |
| | 5,0 | 2,0 | 1,91 ± 0,24 | 95,5 |
| | - | 20,0 | 19,28 ± 0,35 | 96,0 |
| | 5,0 | 20,0 | 20,20 ± 0,52 | 101,0 |
| Poço | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 1,94 ± 0,22 | 97,0 |
| | 5,0 | 2,0 | 1,96 ± 0,33 | 98,0 |
| | - | 20,0 | 20,10 ± 0,41 | 100,5 |
| | 5,0 | 20,0 | 20,08 ± 0,17 | 100,4 |
| Mineral | - | - | - | - |
| | - | 2,0 | 2,07 ± 0,14 | 103,5 |
| | 5,0 | 2,0 | 1,94 ± 0,26 | 97,0 |
| | - | 20,0 | 19,30 ± 0,49 | 96,5 |
| | 5,0 | 20,0 | 19,74 ± 0,46 | 98,7 |

^a Resultados são expressos como valor médio ± desvio padrão (n = 3).

A porcentagem de recuperação obtida na faixa de 92,0-108,7% para dois níveis de concentração na ausência e presença de matéria orgânica mostra que o

método pode ser aplicado para a determinação de Cd^{2+} em diferentes tipos de amostras de água com precisão e exatidão satisfatórias sem o efeito matriz causado pela presença de matéria orgânica. Para demonstrar a aplicabilidade do material, o método proposto também foi aplicado em matrizes alimentícias (linhaça), fitoterápico (*Ginkgo biloba*) e cigarro (Tabela 17).

Tabela 17. Determinação de cádmio em amostras de cigarro, linhaça e *Ginkgo biloba*.

| Amostras | Cd^{2+} ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | Recuperação (%) |
|----------------------|--|-------------------------|-----------------|
| | Adicionado | Encontrado ^a | |
| Cigarro | - | $77,9 \pm 6,3$ | - |
| | 150 | $221,2 \pm 5,7$ | 95,8 |
| | 500 | $583,1 \pm 8,9$ | 106,7 |
| Linhaça 1 | - | $301,8 \pm 15,3$ | - |
| | 250 | $531,9 \pm 15,5$ | 92,0 |
| | 833 | $1127,3 \pm 12,4$ | 97,5 |
| Linhaça 2 | - | $278,3 \pm 11,7$ | - |
| | 250 | $537,1 \pm 14,3$ | 103,5 |
| | 833 | $1116,1 \pm 16,3$ | 101,7 |
| Linhaça 3 | - | $953,6 \pm 38,6$ | - |
| | 250 | $1210,4 \pm 28,9$ | 102,7 |
| | 833 | $1761,9 \pm 32,9$ | 97,4 |
| <i>Ginkgo biloba</i> | - | $221,2 \pm 5,8$ | - |
| | 750 | $1011,3 \pm 28,3$ | 105,3 |
| | 2500 | $2719,2 \pm 28,3$ | 99,1 |

O método foi aplicado com sucesso para a determinação de Cd^{2+} em diferentes amostras de linhaça ($301,8 \pm 15,3 \mu\text{g kg}^{-1}$, $278,3 \pm 11,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $953,6 \pm 38,6 \mu\text{g kg}^{-1}$), *Ginkgo biloba* ($221,2 \pm 5,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) e cigarro ($77,9 \pm 6,3 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em todos os casos a exatidão avaliada pelo teste de adição confirmou que o método pode ser utilizado com sucesso na determinação de Cd^{2+} em diferentes matrizes mesmo em baixos níveis de concentração. A faixa de recuperação obtida para as amostras fortificadas com Cd^{2+} em dois níveis de concentração foi de 92,0-106,7%.

Além disso, a exatidão do método foi confirmada por meio da análise de material certificado de referência TORT-2 (hepatopancreas de lagosta). De acordo com os resultados, não existe diferença significativa entre a concentração encontrada $26,44 \pm 0,57 \text{ mg kg}^{-1}$ obtida pelo método (triplicatas autênticas) e o material certificado de referência ($26,70 \pm 0,60 \text{ mg kg}^{-1}$) ao nível de 95% de confiança (teste t-*Student*), atestando assim a eficiência do método desenvolvido.

Finalmente, é oportuno enfatizar que os métodos utilizados para a quantificação de metais em matéria orgânica são comumente realizados por processos de mineralização ácida para evitar o efeito da matriz. Pela primeira vez foi proposta a síntese de um polímero IIP-RAM- Cd^{2+} para o *clean-up online* de ácido húmico e simultânea determinação de Cd^{2+} evitando etapas de extração, complexação e mineralização. Além disso, o acoplamento da minicoluna IIP-RAM permitiu a injeção direta de amostras no FAAS sem um pré-tratamento prévio, mesmo na presença de altos teores de matéria orgânica. Para nosso conhecimento, não existem polímeros ou métodos publicados que possam ser utilizados eficientemente na determinação direta de Cd^{2+} e simultânea exclusão de AH.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou pela primeira vez a influência dos comonômeros HEMA e da BSA na sorção e seletividade da poli(aliltiourea) em relação à capacidade de extração/pré-concentração de íons Cd^{2+} . Considerando análise elementar do CHNS, os dados demonstraram muita similaridade entre a taxa de conversão da ATU para os polímeros impressos e não impressos e tendo em vista os experimentos de seletividade, pode-se afirmar que a capacidade de reconhecimento do IIP e do IIP-HEMA é atribuída às cavidades de impressão criadas durante a formação da rede polimérica.

O IIP-HEMA apresentou o melhor desempenho para a exclusão de AH sem a perda de seletividade para o íon Cd^{2+} , sendo, portanto, mais indicado para preparar polímeros ionicamente impressos e com acesso restrito. Por outro lado, o polímero IIP-HEMA-BSA embora igualmente eficiente na capacidade de exclusão de AH, não apresentou seletividade, diminuindo o efeito de impressão com a camada revestida da BSA sobre a superfície do polímero IIP-HEMA. O polímero IIP sem qualquer modificação mostrou seletividade adequada para o íon Cd^{2+} , mas sofre com a capacidade de exclusão do AH.

A performance analítica do IIP-HEMA como sorvente para a determinação de Cd^{2+} na presença de AH foi avaliada com precisão e exatidão em amostras reais de água. Além disso, o polímero IIP-HEMA foi utilizado com sucesso em amostras de alimento, fitoterápico e cigarro demonstrando a aplicabilidade do material, mesmo em diferentes matrizes. Podemos ainda destacar o baixo volume de amostra (20,0 mL), satisfatório fator de pré-concentração (37 vezes) e baixo limite de detecção ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$) permitindo a quantificação de Cd^{2+} em baixos níveis de concentração, além de fácil regeneração sem a degradação da superfície e perda das propriedades sortivas.

Como observações finais, os resultados obtidos abrem um campo de investigação interessante na ciência da separação explorando a combinação de impressão química e material de acesso restrito visando o desenvolvimento de materiais seletivos, sem a necessidade de etapas prévias de pré-tratamento em amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Satarug, S. H. Garrett, M. A. Sens, Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes, *Environmental Health Perspectives*, 118 (2010) 182–190.
- [2] T. Inaba, E. Kobayashi, Y. Suwazono, M. Uetani, M. Oishi, H. Nakagawa, K. Nogawa, Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease, *Toxicology Letters*, 159 (2005) 192–201.
- [3] A. Navas-Acien, M. Tellez-Plaza, E. Guallar, P. Muntner, E. Silbergeld, B. Jaar, V. Weaver, Blood Cadmium and Lead and Chronic Kidney Disease in US Adults: A Joint Analysis, *American Journal Epidemiology*, 170 (2009) 1156–1164.
- [4] M. H. Bhattacharyya, B. D. Whelton, P. H. Stern, D. P. Peterson, Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture, *British Journal of Ophthalmology*, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 85 (1988) 8761-8765.
- [5] C. Wang, S. Brown, M. H. Bhattacharyya, Effect of Cadmium on Bone Calcium and ⁴⁵Ca in Mouse Dams on a Calcium-Deficient Diet: Evidence of Itai-Itai-like Syndrome *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127 (1994) 320-330.
- [6] M. H. Bhattacharyya, B. D. Whelton, D. P. Peterson, B. A. Carnes, E. S. Moretti, J. M. Toomey, L. L. Williams, Skeletal changes in multiparous mice fed a nutrient-sufficient diet containing cadmium, *Toxicology*, 50 (1988) 193-204.
- [7] M. Wallin, L. Barregard, G. Sallsten T. Lundh, M. K Karlsson, M. Lorentzon, C. Ohlsson, D. Mellström, Low-Level Cadmium Exposure Is Associated With Decreased Bone Mineral Density and Increased Risk of Incident Fractures in Elderly Men: The MrOS Sweden Study, *Journal of Bone and Mineral Research*, 31 (2016) 732–741.
- [8] Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 2010. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44515/WHO_TRS_960_eng.pdf;jsessionid=302C321272001CCFF2BE27E09766E13C?sequence=1, acessado em janeiro 2019.
- [9] U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium, 2012. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>, acessado em janeiro 2019.
- [10] European Commission (CE), Council directive on the quality of water intended for human consumption, 1998. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:01998L0083-20151027&from=EN>, acessado em janeiro 2019.

- [11] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria Cadmium, 2016. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-03/documents/cadmium-final-report-2016.pdf>, acessado em janeiro 2019.
- [12] World Health Organization (WHO), Guidelines for Drinking-water Quality, 4^oed., 2011. <https://apublica.org/wp-content/uploads/2014/03/Guidelines-OMS-2011.pdf>, acessado em janeiro 2019.
- [13] International Agency Research for Cancer (IARC), Cadmium and Cadmium Compounds. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100C-8.pdf>, acessado em janeiro 2019.
- [14] Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357, 2005. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, acessado em janeiro 2019.
- [15] Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 396, 2008. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>, acessado em janeiro 2019.
- [16] D. Mendil, M. Karatas, M. Tuzen, Separation and preconcentration of Cu(II), Pb(II), Zn(II), Fe(III) and Cr(III) ions with coprecipitation method without carrier element and their determination in food and water samples, *Food Chemistry* 177 (2015) 320–324.
- [17] E. Yilmaz, I. Ocsoy, N. Ozdemir, M. Soylak, Bovine serum albumin-Cu(II) hybrid nanoflowers: An effective adsorbent for solid phase extraction and slurry sampling flame atomic absorption spectrometric analysis of cadmium and lead in water, hair, food and cigarette samples, *Analytica Chimica Acta*, 906 (2016) 110-117.
- [18] Z. A. Allothman, E. Yilmaz, M. Habila, M. Soylak, Solid phase extraction of metal ions in environmental samples on 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol impregnated activated carbon cloth, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 112 (2015) 74–79.
- [19] T. Wen, Q. Fan, X. Tan, Y. Chen, C. Chen, A. Xu, X. Wang, A core–shell structure of polyaniline coated protonic titanate nanobelt composites for both Cr(VI) and humic acid removal, *Polymer Chemistry*, 7 (2016) 785-794.
- [20] A. A. Gouda, S. M. Al Ghannam, Impregnated multiwalled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid phase extraction of trace amounts of heavy metal ions in food and water samples, *Food Chemistry*, 202 (2016) 409-416.
- [21] M. A. Habila, Z. A. AlOthman, E. Yilmazb, M. Soylak, Activated carbon cloth filled pipette tip for solid phase extraction of nickel(II), lead(II), cadmium(II), copper(II) and cobalt(II) as 1,3,4-thiadiazole-2,5-dithiol chelates for ultra-trace detection by

FAAS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, (98) 2018 171-181.

[22] M. Ghaedi, G. Karimipour, E. Alambarkat, A. Asfaram, M. Montazerzohori, S. Izadpanah, M. Soylak, Solid-phase extraction of Pb²⁺ ion from environmental samples onto L-AC-Ag-NP by flame atomic absorption spectrometry (FAAS), *Journal International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95 (2015) 1030-1041.

[23] J. Sastre, A. Sahuquillo, M. Vidal, G. Rauret, Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction, *Analytica Chimica Acta* 462 (2002) 59–72.

[24] M. Ahmed, Y. H. Chin, X. Guo, X. Zhao, Microwave assisted digestion followed by ICP-MS for determination of trace metals in atmospheric and lake ecosystem, *Journal of Environmental Sciences*, 55 (2017) 1-10.

[25] M. S. Islama, M. K. Ahmed, M. Raknuzzaman, M. Habibullah -Al- Mamun, M. K. Islam, Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban river in a developing country, *Ecological Indicators* 48 (2015) 282–291.

[26] R. Sudoh, Md. S. Islam, K. Sazawa, T. Okazaki, N. Hata, S. Taguchi, H. Kuramitz, Removal of dissolved humic acid from water by coagulation method using polyaluminum chloride (PAC) with calcium carbonate as neutralizer and coagulant aid, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015) 770-774.

[27] É. A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224–235.

[28] É. A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 236–248.

[29] É. A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G. A. Gómez-Ríos, E. Boyacı, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249–264.

[30] F. Shakerian, K. Kim, E. Kwon, J. E. Szulejko, P. Kumar, S. Dadfarnia, A. M. H. Shabani, Advanced polymeric materials: Synthesis and analytical application of ion imprinted polymers as selective sorbents for solid phase extraction of metal ions, *Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 55–69.

[31] J. Fu, L. Chen, J. Lia, Z. Zhang, Current status and challenges of ion imprinting, *Journal of Materials Chemistry A*, 3 (2015) 13598-13627.

- [32] J. Fu, X. Wang, J. Li, Y. Ding, L. Chen, Synthesis of multi-ion imprinted polymers based on dithizone chelation for simultaneous removal of Hg²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ and Cu²⁺ from aqueous solutions, *RSC Adv.*, 6 (2016) 44087-44095.
- [33] M. R. Gama, C. B. G. Bottoli, Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation, *J. Chromatogr. B* 1043 (2017) 107-121.
- [34] A. C. B. Dias, E. C. Figueiredo, D. M. Oliveira, M. E. P. B. Siqueira, M. A. Z. Arruda, Online Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers, *Analytical Chemistry Acta* 635 (2009) 102-107.
- [35] L. D. Marestoni, M. P. T. Sotomayor, M. G. Segatelli, L. R. Sartori, C. R. T. Tarley, Polímeros Impressos com Íons: Fundamentos, Estratégias de Preparo e Aplicações em Química Analítica, *Quimica Nova* 36 (2013) 1194-1207.
- [36] C. Branger, W. Meouche, A. Margailan, Recent advances on ion-imprinted polymers, *Reactive & Functional Polymers*, 2013, 73, 859–875.
- [37] X. Cai, J. Li, Z. Zhang, F. Yang, R. Dong, L. Chen, Novel Pb²⁺ Ion Imprinted Polymers Based on Ionic Interaction via Synergy of Dual Functional Monomers for Selective Solid-Phase Extraction of Pb²⁺ in Water Samples, *ACS Applied Materials Interfaces* 6 (2014) 305–313.
- [38] S. Xu, L. Chen, J. Li, Y. Guan, H. Lu, Novel Hg²⁺-imprinted polymers based on thymine–Hg²⁺–thymine interaction for highly selective preconcentration of Hg²⁺ in water samples, *Journal of Hazardous Materials*, 237–238 (2012) 347–354.
- [39] M.G. Santos, M.G. Nakamura, A.J. Santos-Neto, E.C. Figueiredo, Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties, *Analyst* 140 (2015) 7768-7775.
- [40] V. G. Araújo-Neto, C. F. A. Nobre, D. M. De Paula, L. C. Souza, J. C. Silva, M. M. Moreira, P. R. B. Picanço, V. P. Feitosa, Glycerol-dimethacrylate as alternative hydrophilic monomer for HEMA replacement in simplified adhesives, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 82 (2018) 95-101.
- [41] M. Save, J. V. M. Weaver, S. P. Armes, Atom Transfer Radical Polymerization of Hydroxy-Functional Methacrylates at Ambient Temperature: Comparison of Glycerol Monomethacrylate with 2-Hydroxypropyl Methacrylate, *Macromolecules*, 35 (2002) 1152-1159.
- [42] T. Takeuchi, J. Haginaka, Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. B*, 728 (1999) 1-20.
- [43] Y. Lv, J. Zhang, M. Li, S. Zhou, X. Ren, J. Wang, Fast clean-up and selective enrichment of florfenicol in milk by restricted access media molecularly imprinted

magnetic microspheres based on surface-initiated photoiniferter-mediated polymerization, *Anal. Methods* 8 (2016) 3982-3989.

[44] S. Sekula-Neuner, M. de Freitas, L. Tröster, T. Jochum, P.A. Levkin, M. Hirtz, H. Fuchs, Phospholipid arrays on porous polymer coatings generated by micro-contact spotting. *Beilstein J. Nanotechnol.* 8 (2017) 715-722.

[45] J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka, Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. *Journal of Chromatography A*, 84 (1999) 331-339.

[46] S. Souverain, S. Rudaz, J. Veuthey, Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, *Journal of Chromatography B*, 801 (2004) 141–156.

[47] B. Du, T. Qu, Z. Chen, X. Cao, S. Han, G. Shen, L. Wang, A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples, *Talanta* 129 (2014) 465–472.

[48] M. N. Cassiano, J. C. Barreiro, M. C. Moraes, R. V. Oliveira, Q. B. Cass, Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications, *Bioanalysis* (1) 2009 577-594.

[49] M. G. Santos, I. M. C. Tavares, A. F. Barbosa, J. Bettini, E. C. Figueiredo, Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification, *Talanta* 163 (2017) 8-16.

[50] K. Skudar, O. Brüggemann, A. Wittelsberger, O. Ramström, Selective recognition and separation of β -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers, *Anal. Commun.* 36 (1999) 327-331.

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

[52] N. M. Cassiano, J. C. Barreiro, Q. B. Cass, New Trends in Sample Preparation in Brazil: an Overview of Bioanalytical Applications by Liquid Chromatography, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 9-19.

[53] A. J. Santos-Neto, C. Fernandes, J. C. Rodrigues, C. Alves, F. M. Lanças, Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 78-85.

- [54] W. Xu, S. Su, P. Jiang, H. Wang, X. Dong, M. Zhang, Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material *Journal of Chromatography A*, (1217) 2010 7198–7207.
- [55] N. M. Cassiano, V. V. Lima, R. V. Oliveira, A. C. de Pietro, Q. B. Cass, Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography, *Anal Bioanal. Chemistry*, (384) 2006 1462–1469.
- [56] F. A. C. Suquila, L. L. G. De Oliveira, C. R. T. Tarley, Restricted access copper imprinted poly(allylthiourea): The role of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the sorptive performance of imprinted polymer, *Chemical Engineering Journal*, 350 (2018) 714-728.
- [57] L. L. G. de Oliveira, F. A. C. Suquila, F. M. de Oliveira, G. L. Scheel, C. R. T. Tarley, Synthesis and application of restricted access material-ion imprinted poly(allylthiourea) for selective separation of Cd²⁺ and humic acid exclusion, *Reactive and Functional Polymers*, 134 (2019) 93-103.
- [58] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepanska, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *Trends in Analytical Chemistry* 77 (2016) 23–43.
- [59] G. O. I. Moraes, L. M. R. da Silva, Á. J. dos Santos-Neto, F. H. Florenzano, E. C. Figueiredo, A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7687-7696.
- [60] M. M. de Lima, A. C. Vieira, I. Martins, V. B. Boralli, K. B. Borges, E. C. Figueiredo, Online restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis, *Food. Chem.* 197 (2016) 7-13.
- [61] K. K. M. S. da Silva, V. B. Boralli, C. Wisniewski, E. C. Figueiredo, Online Restricted Access Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Directly from Untreated Human Plasma Samples Followed by HPLC-UV Analysis, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2015) 108-116.
- [62] V. M. P. Barbosa, A. F. Barbosa, J. Bettini, P. O. Luccas, E. C. Figueiredo, Direct extraction of lead (II) from untreated human blood serum using restricted access carbon nanotubes and its determination by atomic absorption spectrometry, *Talanta* 147 (2016) 478-484.
- [63] A. F. Barbosa, V. M. P. Barbosa, J. Bettini, P. O. Luccas, E. C. Figueiredo, Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human

serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis, *Talanta* 131 (2015) 213-220.

[64] F.M. de Oliveira, M.G. Segatelli, C.R.T. Tarley, Evaluation of a new water-compatible hybrid molecularly imprinted polymer combined with restricted access for the selective recognition of folic acid in binding assays, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016) 43463-43473.

[65] Y. Liu, X. Meng, M. Luo, M. Meng, L. Ni, J. Qiu, Z. Hu, F. Liu, G. Zhong, Z. Liu, Y. Yan, Synthesis of hydrophilic surface ion-imprinted polymer based on graphene oxide for removal of strontium from aqueous solution, *Journal Material Chemistry A*, 3 (2015) 1287–1297.

[66] W. H. Wong, W. X. Lee, R. N. Ramanan, L. H. Tee, K. W. Kong, C. M. Galanakis, J. Sun, K. N. Prasad, Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product , *Industrial Crops and Products*, 63 (2015) 238-248.

[67] *Statistica for Windows*, StatSoft, Inc (1999), Tulsa, USA.

[68] W. N. L. dos Santos, C. M. C. Santos, S. L. C. Ferreira, Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal*, 75 (2003) 211–221.

[69] S. L. C. Ferreira, W. N. L. dos Santos, M. A. Bezerra, V. A. Lemos, J. M. Bosque-Sendra, Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimization of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 375 (2003) 443–449.

[70] International Union of Pure and Applied Chemistry, Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. K. Danzer, L. A. Currie, *Pure and Applied Chemistry* 70 (1998) 993-1014.

[71] C. R. T. Tarley, M. Z. Corazza, B. F. Somera, Mariana Gava Segatelli Preparation of new ion-selective cross-linked poly(vinylimidazole-coethylene glycol dimethacrylate) using a double-imprinting process for the preconcentration of Pb²⁺ ions, *Journal of Colloid and Interface Science* 450 (2015) 254–263.

[72] U. Katrahalli, S. S. Kalanur, J. Seetharamappa, Interaction of Bioactive Coomassie Brilliant Blue G with protein: Insights from Spectroscopic Methods, *J. Scientia Pharmaceutica* 78 (2010) 869-880.

[73] C. Feng, M. Li, M. Li, Q. Zeng, Q. Gan, H. Yang, Synthesis and characterization of a surface-grafted Cd (II) ion-imprinted polymer for selective separation of Cd (II) ion from aqueous solution, *App. Surf. Sci.* 332 (2015) 463-472.

- [74] M. G. Segatelli, V.S. Santos, A. B. T. Presotto, I.V.P. Yoshida, C.R.T. Tarley, Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly (ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole), *React. Funct. Polym.* 70 (2010) 325-333.
- [75] N. R. Dhumane, S. S. Hussaini, V. G. Dongre, P. P. Karmuse, M. D. Shirsat, Growth and characterization of glycine doped bis thiourea cadmium chloride single crystal, *Cryst. Res. Technol.* 44 (2009) 269-274.
- [76] N. S. G. Reddy, K. M. Rao, K. S .V. K. Rao, C. Ha, Synthesis of 1-acryloyl-3-phenyl thiourea based pH sensitive hydrogels for removal of samarium and terbium, *Macromol. Res.* 24 (2016) 494-501.
- [77] A. M. Basaglia, M. Z. Corazza, M. G. Segatelli, C. R. T. Tarley, Synthesis of Pb(II)-imprinted poly(methacrylic acid) polymeric particles loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) for micro-solid phase preconcentration of Pb²⁺ online coupled to flame atomic absorption spectrometry, *RSC Advances* 7 (2017) 33001-33011.
- [78] N. Sahiner, N. Karakoyun, T. Sahan, S. Butun, N. Aktas, Reusable Soft Hydrogels for Gold Recovery from Acidic Environments, *Sep. Sci. Technol.* 48 (2013) 805-812.
- [79] F. M. de Oliveira, B. F. Somera, E. S. Ribeiro, M. G. Segatelli, M. J. F. Yabe, E. Galunin, C. R. T. Tarley, Kinetic and Isotherm Studies of Ni²⁺ Adsorption on Poly(methacrylic acid) Synthesized through a Hierarchical Double-Imprinting Method Using a Ni²⁺ Ion and Cationic Surfactant as Templates, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 8550-8557.
- [80] M. Jalilzadeh, L. Uzun, S. Senel, A. Denizli, Specific heavy metal ion recovery with ion-imprinted cryogels, *Journal Applied Polymer Science*, 133 (2016), 43095-43104.
- [81] N. Sahiner, S. Malci, O. Celikbiçak, O. Kantoglu, B. Salih, Radiation synthesis and characterization of new hydrogels based on acrylamide copolymers cross-linked with 1-allyl-2-thiourea *Radiation Physics and Chemistry* 74 (2005) 76-85.
- [82] A. Alomar, A. Landreau, M. Kempf, M.A. Khan, M. Allain, G. Bouet, Synthesis, crystal structure, characterization of zinc(II), cadmium(II) complexes with 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone (3TTSCH). Biological activities of 3TTSCH and its complexes, *Journal Inorganic Biochemistry* 104 (2010) 397-404.
- [83] N. Karthik, M. G. Sethuraman, Surface protection of copper by allyl thiourea and hybrid sol-gel coatings, *Surface protection of copper by allyl thiourea and hybrid sol-gel coatings*, *Prog. Org. Coat.* 90 (2016) 380-389.

- [84] S. Mishra, N. Verma, Surface ion imprinting-mediated carbon nanofiber-grafted highly porous polymeric beads: Synthesis and application towards selective removal of aqueous Pb(II), *Chem. Eng. J.* 313 (2017) 1142-1151.
- [85] P. Lulinski, P. Kalny, J. Giebułtowicz, D. Maciejewska, P. Wroczynski, Synthesis and characterization of cadmium(II)-imprinted poly(1-allyl-2-thiourea-co-ethylene glycol dimethacrylate) particles for selective separation, *Polym. Bull.* 71 (2014) 1727-1741.
- [86] D. Ghanbari, M. Salavati-Niasari, M. Sabet, Polymeric Matrix Nanocomposites: Influence of Cadmium Sulfide Nanostructure on the Thermal Degradation of Poly(Vinyl Alcohol) and Cellulose Acetate, *Journal Cluster Science*, 23 (2012), 1081-1095.
- [87] J. Kuljanin-Jakovljevic, M. Marinovic-Cincovic, Z. Stojanovic, A. Krkljes, N. D. Abazovic, M. I. Comor, Thermal degradation kinetics of polystyrene/cadmium sulfide composites, *Polymer Degradation and Stability*, 94 (2009), 891-897.
- [88] R.H. McMenemy, Albumin binding sites. In: *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press Inc, Oxford, 1977.
- [89] H. Yan, K.H. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *Int. J. Mol. Sci.* 7 (2006) 155-178.
- [90] F. M. de Oliveira, M.G. Segatelli, C.R.T. Tarley. Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples, *Anal. Methods* 8 (2016) 656-665.
- [91] S. Yu, F. L. Ng, K. C. C. Ma, A. A. Mon, F.L. Ng, Y. Y. Ng, Effect of Porogenic Solvent on the Porous Properties of Polymer Monoliths, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 2641-2647.
- [92] R. Vendamme, W. Eevers, M. Kaneto, Y. Minamizaki, Influence of Polymer Morphology on the Capacity of Molecularly Imprinted Resins to Release or to Retain their Template. *Polymer Journal*, 41 (2009), 1055-1066.
- [93] A. Corma, From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis, *Chem. Rev.* (97) 1997 2373-2419.
- [94] S. Veerananarayanan, A. C. Poulouse, M. S. Mohamed, Y. Nagaoka, S. Iwai, Y. Nakagame, S. Kashiwada, S. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, Synthesis and application of luminescent single CdS quantum dot encapsulated silica nanoparticles directed for precision optical bioimaging. *International Journal of Nanomedicine*, 7 (2012) 3769-3786.
- [95] G. Colak, M. C. Baykul, R. Gurler, E. Catak, N. Caner, Investigation of the effects of cadmium by micro analytical methods on *Lycopersicon esculentum* Mill. Roots. *Acta Biologica Hungarica*, 65 (2014) 319-330.

- [96] P. M. Collman, M. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Moris, J. A. Ramshaw, M. P. Venkatappa, X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution, *Nature*, 272 (1978) 319-324.
- [97] A. B. T. Ghisaidoobe, J. S. Chung, Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the detection and Analysis of Proteins: A Focus on Foster Resonance Energy Transfer Techniques, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2014), 22518-22538.
- [98] E. Balaur, J.M. Macak, L. Taveira, P. Schmuki, Tailoring the wettability of TiO₂ nanotube layers, *Electrochemistry Communications* 7 (2005) 1066-1070.
- [99] M. Gray, M.G. Johnson, M.I. Dragila, M. Kleber, Water uptake in biochars: The roles of porosity and hydrophobicity, *Biomass Bioenerg.* 61 (2014) 196-205.
- [100] Y. Ito, Y. Tanabe, J. Han, T. Fujita, K. Tanigaki, M. Chen, Multifunctional Porous Graphene for High-Efficiency Steam Generation by Heat Localization, *Adv. Mat.* 27 (2015) 4302-4307.
- [101] L. Xu, Y. Huang, Q. Zhu, C. Ye, Chitosan in Molecularly-Imprinted Polymers: Current and Future Prospects, *International Journal of Molecules Science*, 16 (2015) 18328-18347.
- [102] T. S. Anirudhan, S. Sandeep, Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer of N-maleoylchitosan-grafted-2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid and its controlled delivery and recognition of bovine serum albumin, *Polym. Chem.*, 2 (2011) 2052–2061.
- [103] A. Tuncel, K. Ecevit, K. Kesenci, E. Piskin, Nonswellable and Swellable Ethylene Glycol Dimethacrylate-Acrylic Acid Copolymer Microspheres, *Polymer Chemistry*, 34 (1996) 45-55.
- [104] C. Hu, D. Yang, Z. Wang, P. Huang, X. Wang, D. Chen, D. Cui, M. Yang, N. Jia, Bio-mimetically synthesized Ag@BSA microspheres as a novel electrochemical biosensing interface for sensitive detection of tumor cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 41 (2013), 656-662.
- [105] A. Vallée, V. Humblot, R. Al Housseinya, S. Boujdaya, C. Pradier, BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109 (2013), 136-142.
- [106] R.A.B. Gomes, P.O. Luccas, C.S. de Magalhães, E.C. Figueiredo, Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin, *J. Mat. Sci.* 51 (2016) 7407-7414.
- [107] M. Kosmulski, Isoelectric points and points of zero charge of metal hydroxides: 50 years after Parks' review, *Adv. Colloid Interfac. Sci.* 238 (2016) 1-61.

- [108] J. Poon, C. Batchelor-McAuley, K. Tschulik, R. G. Single graphene nanoplatelets: capacitance, potential of zero charge and diffusion coefficient, *Compton. Chem. Sci.*, 2015, 6, 2869-2876.
- [109] C. Chaiyasut, T. Tsuda, Isoelectric Point Estimation of Proteins by Electroosmotic Flow: pH Relationship Using Physically Adsorbed Proteins on Silica Gel, *Chromatography* 22 (2001) 91-95.
- [110] R.G. Pearson, Hard and Soft Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533-3539.
- [111] S. M. Ansar, R. Haputhanthri, B. Edmonds, D. Liu, L. Yu, A. Sygula, D. Zhang, Determination of the Binding Affinity, Packing, and Conformation of Thiolate and Thione Ligands on Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011), 653-660.
- [112] C. K. Ahn, D. Park, S.H. Woo, J.M. Park, Removal of Cationic Heavy Metal from Aqueous Solution by Activated Carbon Impregnated with Anionic Surfactants, *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 1130-1136.
- [113] N. Lechani, M. Hamdi, F. Aklil, S. Khabouche, O. B. Baitich, D. Kheffache, S. Moussi, O. Ouamerali, Complexation of manganese (II), cobalt (II), nickel (II) and copper (II) by a ligand derived from 1,2,4-triazole: Potentiometric studies and density functional theory calculations, *Eur. J. Chem.* 4 (2013) 285-291.
- [114] K. Swaminathan, H. M. N. H. Irving, Stability constants of complexes of thiourea with nickel, cobalt and bismuth, *Journal Inorg. Nucl. Chem.*, 28 (1966) 171-175.
- [115] F. Jalilehvand, Z. Amini, K. Parmar, Cadmium (II) Complex Formation with Selenourea and Thiourea in Solution: An XAS and ^{113}Cd NMR Study, *Inorganic Chemistry*, 51 (2012) 10619-10630.
- [116] Y. Zhu, H. Liang, R. Yu, G. Hu, F. Cheng, Removal of Aquatic Cadmium Ions Using Thiourea Modified Poplar Biochar, *Water*, 12 (2020) 1117-1134.
- [117] J. S. Casas, M. S. García-Tasende, J. Sordo, Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review, *Coordination Chemistry Reviews*, 209 (2000) 197-261.
- [118] F. Soleimanil, H. Aghaiel, F. Gharib, Hydrolysis of cadmium cation in different ionic strength, *J. Phys. Theor. Chem.* 5 (2008) 73-78.
- [119] F. Soleimanil, H. Aghaiel, F. Gharib, Hydrolysis of cadmium cation in different ionic strength. *Journal of Physical and Theoretical Chemistry*, 5 (2008), 73-78.
- [120] A. M. Anielak, R. Schmidt, Sorption of Lead and Cadmium cations on Natural and Manganese-Modified Zeolite, *Polish Journal of Environmental Studies*, 20 (2011), 15-19.

- [121] M. Li, C. Feng, M. Li, Q. Zeng, Q. Gan, H. Yang, Synthesis and characterization of a surface-grafted Cd (II) ion-imprinted polymer for selective separation of Cd (II) ion from aqueous solution, *Applied Surface Science*, 332 (2015) 463-472.
- [122] L. Ding, X. Luo, P. Shao, J. Yang, D. Sun, Thiol-functionalized Zr-based metal-organic framework for capture of Hg(II) through a proton exchange reaction, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6 (2018) 8494–8502.
- [123] B. Saha, S. Chakraborty, G. Das, A Rational Approach for Controlled Adsorption of Metal Ions on Bovine Serum Albumin-Malachite Bionanocomposite, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 9817-9825.
- [124] A. Ravindran, A. Singh, A.M. Raichur, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA), *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 76 (2010) 32-37.
- [125] Q. Chen, D. Yin, S. Zhu, X. Hu, Adsorption of cadmium(II) on humic acid coated titanium dioxide, *Journal of Colloid and Interface Science* 367 (2012) 241–248.
- [126] J. Liu, Z. Zhao, G. Jiang, Coating Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles with Humic Acid for High Efficient Removal of Heavy Metals in Water, *Environ. Sci. Technology*, 42 (2008) 6949–6954.
- [127] S. Kang, B. Xing, Humic Acid Fractionation upon Sequential Adsorption onto Goethite, *Langmuir*, 24 (2008) 2525-2531.
- [128] S. Deng, R. B. Bai, Aminated Polyacrylonitrile Fibers for Humic Acid Adsorption: Behaviors and Mechanisms, *Environ. Sci. Technology* 37 (2003) 5799-5805.
- [129] T.I. Moiseenko, N.A. Gashkina, M.I. Dinu, T.A. Kremleva, V.Y. Khoroshavin, Aquatic Geochemistry of Small Lakes: Effects of Environment Changes, *Geochem. Int.* 51 (2013) 1031-1148.
- [130] Y. Chen, J. Ma, Y. Li, L. Weng, Enhanced cadmium immobilization in saturated media by gradual stabilization of goethite in the presence of humic acid with increasing pH, *Science of the Total Environment* 648 (2019) 358–366.
- [131] T.I. Moiseenko, M.I. Dinu, N.A. Gashkina, T.A. Kremleva, Metal Speciation in Natural Waters and Metal Complexing with Humic Matter, *Doklady Earth Sci.* 442 (2012) 267-271.
- [132] T. Wen, Q. Fan, X. Tan, Y. Chen, C. Chen, A. Xu, X. Wang. A core-shell structure of polyaniline coated protonic titanate nanobelt composites for both Cr(VI) and humic acid removal, *Polymer Chemistry*, 7 (2016) 785-794.

- [133] L. Wang, H. Li, Y. Yang, D. Zhang, M. Wu, B. Pan, B. Xing, Identifying structural characteristics of humic acid to static and dynamic fluorescence quenching of phenanthrene, 9-phenanthrol, and naphthalene, *Water Research*, 122 (2017) 337-344.
- [134] M. I. Dinu, Comparison of Complexing Ability of Fulvic and Humic Acids in the Aquatic Environment with Iron and Zinc Ions, *Water Resources*, 37 (2010) 65-69.
- [135] M. C. P. Barros, J. R. Paula, M. O. O. Rezende, Caracterização Físico-Química do Ácido Húmico de Solo da Ilha de Cananéia e de sua Interação com Fe(III), Cu(II) e Cd(II), *Química Nova* 17 (1994) 376-380.
- [136] J. Michałowski, P. Hałaburda, A. Kojło, Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 143-148.
- [137] L. P. Canellas, G. A. Santos, A. A. Moraes, V. M. Rumjanek, F. L. R. Olivares. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN ¹³C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24 (2000) 741-750,.
- [138] J. E. Birdwell, A. S. Engel, Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy, *Organic Geochemistry* 41 (2010) 270-280.
- [139] M. Fuentes, G. Gonzalez-Gaitano, J. M. García-Mina, The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts, *Organic Geochemistry*, 37 (2006) 1949-1959.
- [140] D.D. Ebbing, S.D. Gammon, *General Chemistry*, Houghton Mifflin Company, United States of America, 9^o ed., 2009.
- [141] R.D. Shannon, C.T. Prewitt, Effective Ionic Radii in Oxides and Fluorides, *Acta Cryst. B* 25 (1969) 925-946.
- [142] G. Klopman, Chemical Reactivity and the Concept of Charge- and Frontier-Controlled Reactions, *Journal of the American Chemical Society*, 90 (1968) 223-234.
- [143] B. B. Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns, *Como Fazer Experimentos, Pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria*, Editora Unicamp, Campinas, São Paulo 2001.
- [144] C. A. de Sousa, M. A. L. Junior, R. L. C. Ferreira, Avaliação de testes estatísticos de comparações múltiplas de médias, *Rev. Ceres, Viçosa*, 59 (2012), 350-354.
- [145] M. Gawin, J. Konefał, B. Trzewik, S. Walas, A. Tobiasz, H. Mrowiec, E. Witek, Preparation of a new Cd(II)-imprinted polymer and its application to determination of

cadmium(II) via flow-injection-flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 80 (2010) 1305–1310.

[146] B. Zargar, A. Khazaeifar, Synthesis of an ion-imprinted sorbent by surface imprinting of magnetized carbon nanotubes for determination of trace amounts of cadmium ions, *Microchimica Acta*, (184) 2017 4521–4529.

[147] M. C. Barciela-Alonso, V. Plata-Garcia, A. Rouco-López, A. Moreda-Pineiro, P. Bermejo-Barrera, Ionic Imprinted Polymer Based Solid Phase Extraction for Cadmium and Lead Pre-Concentration/Determination in Seafood, *Microchemical Journal*, (114) 2014 106–110.

[148] N. Ashouri, A. Mohammadi, R. Hajiaghaee, M. Shekarchi, M. R. Khoshayand, Preparation of a new nanoparticle Cd(II)-imprinted polymer and its application for selective separation of cadmium(II) ions from aqueous solutions and determination via inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Desalination and Water Treatment* 57 (2016) 14280–14289.

[149] M. Behbahani, M. Barati, M. K. Bojdi, A. R. Pourali, A. Bagheri, N. A. G. Tapeh, A nanosized cadmium(II)-imprinted polymer for use in selective trace determination of cadmium in complex matrices, *Microchimica Acta*, (180) 2013 1117–1125.