



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Giuliana Salvador Tomasin

Desenvolvimento de procedimento DPX para determinação sensível de Cu(II) em água para hemodiálise por F AAS utilizando sementes de *Moringa oleifera* como fase sólida

Uberlândia
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Giuliana Salvador Tomasin

Desenvolvimento de procedimento DPX para determinação sensível de Cu(II) em água para hemodiálise por F AAS utilizando sementes de *Moringa oleifera* como fase sólida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Nivia Maria Melo Coelho

Uberlândia

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

T655 2020	<p>Tomasin, Giuliana Salvador, 1984- Desenvolvimento de procedimento DPX para determinação sensível de Cu(II) em água para hemodiálise por F AAS utilizando sementes de Moringa oleifera como fase sólida [recurso eletrônico] / Giuliana Salvador Tomasin. - 2020.</p> <p>Orientador: Nivia Maria Melo Coelho. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.708 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Química. I. Coelho, Nivia Maria Melo, 1966-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p>CDU: 54</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 318, PPGQUI				
Data:	vinte e cinco de setembro de dois mil e vinte	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	11812QMI005				
Nome do Discente:	Giuliana Salvador Tomasin				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de procedimento DPX para determinação sensível de Cu(II) em água de hemodiálise por FAAS utilizando sementes de Moringa oleífera como fase sólida.				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Biorremediação Química				

Reuniu-se por meio de webconferência, plataforma Google Meet, link: meet.google.com/joe-esvj-vus, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: João Flávio da Silveira Petrucí, da UFU; Hélen Cristine de Rezende, da UFG e Nívia Maria Melo Coelho, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Nívia Maria Melo Coelho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **João Flávio da Silveira Petrucí, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/10/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nivia Maria Melo Coelho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/10/2020, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hélen Cristine de Rezende, Usuário Externo**, em 19/10/2020, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2299312** e o código CRC **26E1469D**.

Dedico este trabalho à Deus, ao meu esposo André pela paciência, amor e companheirismo, ao meu filho Leonardo pelos momentos que estive ausente e à minha família pelo suporte e incentivo acadêmico desde a graduação. Esse apoio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, proteção, perseverança e fé.

À minha família pelo amor e incentivo do início ao fim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e à CAPES pela oportunidade e financiamento.

Ao Grupo de Pesquisas em Materiais Inorgânicos (GMIT) e FAPEMIG pelas análises de FTIR.

Aos professores, técnicos e funcionários da Universidade Federal de Uberlândia.

À minha orientadora Nivia pela confiança, paciência e orientação.

À Weida pelos ensinamentos, paciência do início ao fim e apoio na escrita do artigo.

Ao Bruno Elias pelos ensinamentos e apoio na escrita do artigo.

À Josiele Conrado pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos amigos e colegas e laboratório pela amizade e companheirismo.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O cobre é um micronutriente essencial para a manutenção das funções biológicas de muitos organismos vivos, portanto, baixas concentrações desse elemento podem ser prejudiciais em alguns ambientes. Na água para hemodiálise concentrações acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre pode comprometer à saúde de pacientes em tratamento de diálise. Diferentes técnicas de pré-concentração de cobre tem sido amplamente investigadas como etapa de preparo de amostras e detecção por AAS, UV-Vis e técnicas eletroanalíticas, em diferentes matrizes. A Disposable Pipette Extraction (DPX) é uma técnica de extração de fase sólida em ponteiras descartáveis com rápida extração de analitos, quantidades reduzidas de adsorvente e baixos volumes de solventes e amostras. Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de utilização de diferentes fases sólidas acondicionadas no interior da ponteira. Desse modo, o uso do DPX com o uso da polpa da semente de *Moringa oleifera* apresenta uma alternativa viável e de baixo custo. Uma revisão na literatura aponta que o uso da DPX na determinação de metais tem sido pouco explorada, sendo que a maior parte dos trabalhos envolvem a DPX na determinação de compostos orgânicos em matrizes variadas. O dispositivo DPX é uma patente comercial, no entanto, adaptações com ponteiras de micropipetas viabilizam o uso da técnica com o uso de dispositivos acessíveis e de baixo custo. As sementes de *Moringa oleifera* Lam. são naturais, de baixo custo e com um elevado potencial adsorptivo, muito utilizadas em procedimentos de extração e pré-concentração para vários metais. Este trabalho desenvolveu um procedimento de extração e pré-concentração usando a DPX com o dispositivo adaptado e a polpa de sementes de *Moringa Oleifera* Lamarck como fase sólida na determinação de íons Cu(II) em água para hemodiálise a níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, por F AAS. O dispositivo DPX proposto permite o uso de ponteiras de micropipeta de 5 mL, seringa de 20 mL, adaptador cilíndrico de polietileno, lã de vidro, sendo de fácil operação, simples e baixo custo. Ensaios de caracterização mostram que as sementes de *Moringa* apresentam grupos funcionais característicos do conteúdo proteico (FT-IR), uma superfície irregular e rugosa, permitindo espaços não preenchidos, característicos de matriz heterogênea relativamente porosa (MEV) e superfície negativa acima de pH 4,2 favorável à interação com espécies catiônicas ($\text{pH}_{\text{PCZ}} = 4,2$). As variáveis de extração e pré-concentração otimizadas permitiu o uso de 10 mg da fase sólida a $250 \mu\text{m}$, 6 ciclos de extração com novas porções de amostra a pH 6 e eluição com solução de ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($250 \mu\text{L}$). A curva de pré-concentração apresentou uma linearidade satisfatória de acordo com os parâmetros avaliados ($r = 0,9991$, distribuição aleatória dos resíduos e teste de Mandel ($9,14 < F = 10,01$)). Foram obtidos fator de pré-concentração, limite de detecção e recuperação de 50, $0,64 \mu\text{g L}^{-1}$ e 92,9 - 100,5 %, respectivamente. A precisão foi 6,2 % ($n = 9$). Os resultados de desempenho do procedimento de extração e pré-concentração com o dispositivo DPX adaptado são promissores para determinações de íons Cu(II) em água para hemodiálise.

Palavras-chave: metais, caracterização do biosorvente, extração de fase sólida miniaturizada, preparo de amostra, teste de Mandel, água para hemodiálise.

ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient for maintaining the biological functions of many living organisms, so low concentrations of this element can be harmful in some environments. In water for hemodialysis, concentrations above $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of copper can compromise the health of patients undergoing dialysis treatment. Different copper preconcentration techniques have been extensively investigated in the sample preparation stage and detection by AAS, UV-Vis and electroanalytical techniques, in different matrices. Disposable Pipette Extraction (DPX) is a solid phase extraction technique on disposable tips with rapid extraction of analytes, reduced amounts of adsorbent and low volumes of solvents and samples. Another advantage of this technique is the possibility of using varied solid phases stored inside the tip. Thus, the use of DPX with the use of *Moringa oleifera* seeds pulp presents a viable and low cost alternative. A review of the literature shows that the use of DPX in the determination of metals has been little explored, and most of the work involves DPX in the determination of organic compounds in several matrices. The DPX device is a commercial patent, however, adaptations with micropipette tips allow the use of the technique with the use of accessible and low cost devices. *Moringa oleifera* Lam. seeds are natural, low cost and with a high adsorptive potential, widely used in extraction and preconcentration procedures for various metals. This work developed an extraction and preconcentration procedure using the DPX with the adapted device and *Moringa oleifera* Lamarck seeds pulp as a solid phase in the determination of Cu(II) ions in hemodialysis water at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels, by F AAS. The proposed DPX device allows the use of 5 mL micropipette tips, 20 mL syringe, cylindrical polyethylene adapter, glass wool, being easy to operate, simple and low cost. Characterization tests show that *Moringa* seeds have functional groups characteristic of protein content (FT-IR), an irregular and rough surface, allowing unfilled spaces, characteristic of a relatively porous heterogeneous matrix (SEM) and negative surface above pH 4.2 favorable to interaction with cationic species ($\text{pH}_{\text{PCZ}} = 4.2$). The optimized extraction and preconcentration variables allowed the use of 10 mg of the solid phase at 250 μm , 6 extraction cycles with new sample portions at pH 6 and elution with 0.5 mol L^{-1} hydrochloric acid solution (250 μL). The preconcentration curve showed satisfactory linearity according to the parameters evaluated ($r = 0.9991$, random distribution of residues and Mandel test ($9.14 < F = 10.01$)). Preconcentration factor, detection limit and recovery of 50, $0.64 \mu\text{g L}^{-1}$ and 92.9-100.5%, respectively, were obtained. The accuracy was 6.2% ($n = 9$). The performance results of the extraction and preconcentration procedure with the adapted DPX device are promising for determinations of Cu(II) ions in hemodialysis water.

Keywords: metals, biosorbent characterization, miniaturized solid phase extraction, sample preparation, Mandel test, hemodialysis water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Árvore de <i>Moringa oleifera</i> . Fonte: ALVES, 2013. Foto: Almeida, I. L. S., Uberlândia, 2010 (B) Raiz de <i>Moringa oleifera</i> . Fonte: Raiz da Moringa. Disponível em: https://amarnatureza.org.br/raiz-da-moringa/ . Acesso em: 15 set. 2020. (C) Folhas de <i>Moringa oleifera</i> . Fonte: EMBRAPA, Foto: Nicoli Dichoff. Disponível em https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/19823237/moringa-para-todos-os-gostos . Acesso em: 15 set. 2020. (D) Vagens de <i>Moringa oleifera</i> . Fonte: ALVES, 2013. Foto: Almeida, I. L. S., Uberlândia, 2010. (E) (I) Cascas, (II) Polpa e (III) Sementes integrais de <i>Moringa oleifera</i> Lam. Fonte: O Autor.	30
Figura 2: Corte transversal de uma lâmpada de cátodo oco (FONTE: SKOOG; HOLLER; CROUCH, p. 238, 2008).	34
Figura 3: (A) Dispositivo DPX comercial 5 mL; (B) Dispositivo DPX adaptado: conector de tubo de polietileno, ponteira de micropipeta tipo Gilson de 5 mL e seringa 20 mL; (C) Adsorvente de pó de polpa de sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. e lâ de vidro. Fonte: Próprio autor.	40
Figura 4: Esquema do procedimento de extração e pré-concentração DPX. Fonte: Próprio autor.	41
Figura 5: Distribuição de resíduos (FONTE: Material disponibilizado no curso de Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade, oferecido à distância pela Universidade do Minho, Braga - PT, 2017).	47
Figura 6: Espectro de Infravermelho Médio da polpa da semente de <i>Moringa oleifera</i> “ <i>in natura</i> ”.	52
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da polpa de semente de <i>Moringa oleifera</i> com ampliações de 100-5000 X para o material em branco “ <i>in natura</i> ” (A - C) e após extração (D - F).	54
Figura 8: Estudo do pH _{PCZ} com 50 mg de polpa da semente de <i>Moringa oleifera</i> em 50 mL de água deionizada com ajuste de pH 1 a 12. Agitação em mesa orbital, por 1 h e equilíbrio por 24h.	56
Figura 9: pH _{PCZ} por meio gráfico, obtido pela diferença entre pH inicial e final (após 24h equilíbrio) em função do pH inicial.	57
Figura 10: Estudo do pH: Razão da absorbância final de eluição sobre a absorbância inicial do padrão de Cu(II) com o pH ajustado, em cada ponto.	59
Figura 11: Estudo do condicionamento do adsorvente. Condições preliminares: 4 mL Cu(II) 2,0 mg L ⁻¹ , 2 ciclos extração, 0,2 mL de eluente de HCl 0,5 mol L ⁻¹ , 15 mg de polpa de semente de <i>Moringa oleifera</i> a 250 µm.	60
Figura 12: Estudo do tamanho de partícula. Condições preliminares: 4 mL da solução pH 6, 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ como eluente, 15 mg pó de semente de <i>Moringa oleifera</i> , sem condicionamento do adsorvente.	61
Figura 13: Estudo da massa do adsorvente. Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L ⁻¹ pH 6, 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ como eluente, tamanho de partícula de 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.	62
Figura 14: Estudo dos ciclos de extração. Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L ⁻¹ pH 6; 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.	63

Figura 15: Variação da quantidade de ciclos de extração (novas alíquotas). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L ⁻¹ pH 6; 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, , sem condicionamento do adsorvente.	64
Figura 16: Estudo da concentração de Cu(II). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,05 mg L ⁻¹ pH 6; 6 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.	65
Figura 17: Estudo das condições de eluição. (A) Concentração da solução de HCl (0,05 – 1,0 mol L ⁻¹) (B) Volume de HCl (200 – 350 µL) (C) Ciclos de eluição (1-2). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,05 mg L ⁻¹ pH 6; 6 ciclos extração, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.	65
Figura 18: Curvas de calibração analíticas (A) sem PC e (B) com PC.	66
Figura 19: Análises de resíduos das curvas de calibração (A) sem PC e (B) com PC de íons Cu(II).	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do cobre e alguns sais de cobre ^a	18
Tabela 2: Ingestão diária de cobre recomendada em suplementos alimentares (ANVISA, 2018).	20
Tabela 3: Padrão de qualidade da água para hemodiálise (ANVISA, RDC 11:2014).	22
Tabela 4: Comparação de diferentes metodologias para pré-concentração de cobre em diferentes matrizes.	25
Tabela 5: Condições de operação utilizadas na detecção de cobre por F AAS.	38
Tabela 6: Resultados de EDS (% em massa) da polpa da semente de <i>Moringa oleifera</i> (PSMO) “ <i>in natura</i> ” e adsorvido obtidos pelo EDS com o aumento de 100 e 1000 vezes.	55
Tabela 7: Resultados das análises do teste de Mandel para as curvas de calibração sem PC e com PC de íons Cu(II).	67
Tabela 8: Figuras de Mérito do procedimento DPX otimizado para íons Cu(II) em meio aquoso.	68
Tabela 9: Recuperação de íons Cu(II) em amostras água para hemodiálise pelo procedimento DPX.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMI	Association for the Advancement of Medical Instrumentation
ANP	Agência Nacional de Petróleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CPHD	Concentrado Polieletrólítico para Hemodiálise
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica do inglês Atomic Absorption Spectrometry
CV	Coeficiente de Variação
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
DOQ-CGCRE-008	Coordenação Geral de Acreditação
DPX	Extração em Ponteiros Descartáveis do inglês Disposable Pipette Extraction
dSPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva do inglês Dispersive Solid Phase Extraction
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva do inglês Energy Dispersive Spectroscopy
EHC	Environmental Health Criteria 200
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry
FE	Fator de Enriquecimento
FIA	Análise por Injeção em Fluxo do inglês Flow Injection Analysis
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier do inglês Fourier Transform Infrared
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite do inglês Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrometry
HD	Hemodiálise
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta eficiência com Detector de Arranjo de Diodos do inglês High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection
HR – CS GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite com Fonte Contínua de Alta Resolução do inglês High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
ICH	ICH Harmonised Tripartite Guideline

ICP – MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP – OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
LC - DAD	Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos do inglês Liquid Chromatography with Diode Array Detection
LC - MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas do inglês Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LD	Limite de detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido do inglês Liquid-Liquid Extraction
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>M. oleífera</i> Lam.	<i>Moringa oleífera</i> Lamarck
PC	Pré-concentração
PG	Valor do teste
H _{IEC}	Ponto Isoelétrico
pH _{PCZ}	Ponto de Carga Zero
PmPDA/CNT	Poly <i>m</i> -phenylenediamine/carbon nanotube
RSD	Desvio Padrão Relativo do inglês Relative Standard Deviation
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SDME	Microextração em Gota Única do inglês Single-Drop Microextraction
SPE	Extração em Fase Sólida do inglês Solid Phase Extraction
TFME	Microextração de Filme Fino do inglês Thin Film Microextraction
TRS	Terapias Renais Substitutivas
UV-Vis	Espectrofotometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-Visível do inglês Ultraviolet-Visible Spectrophotometry
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Cobre.....	17
2.2. Água para hemodiálise.....	21
2.3. Métodos analíticos de detecção e quantificação de cobre	23
2.4. Técnicas de Preparo de Amostras: Extração em Fase Sólida (SPE) e Disposable Pipette Extraction (DPX)	26
2.5. Sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	28
2.6. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS)	32
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos Específicos.....	37
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
4.1. Instrumentação.....	38
4.2. Reagentes, soluções padrão e amostra	39
4.3. Preparação do adsorvente natural	39
4.4. Preparo do sistema DPX	39
4.5. Procedimento DPX e otimização da pré-concentração de Cu(II)	41
4.6. Ponto de Carga Zero (pH _{PCZ}).....	42
4.7. Validação do procedimento analítico.....	42
4.7.1. Limite de detecção.....	42
4.7.2. Limite de quantificação	43
4.7.3. Curva de calibração e linearidade.....	43
4.7.4. Avaliação da linearidade: coeficiente de correlação, teste de Mandel, análise de resíduos	44
4.7.5. Fator de enriquecimento	47
4.7.6. Precisão.....	48
4.7.7. Exatidão	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1. Caracterização das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	52
5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho Médio por transformada de Fourier (FT-IR)	52
5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
5.1.3. pH _{PCZ}	55

5.2.	Otimização do procedimento DPX	58
5.2.1.	Estudos do pH e do eluente	58
5.2.2.	Condicionamento do adsorvente natural	60
5.2.3.	Estudo do tamanho da partícula do adsorvente natural	60
5.2.4.	Estudo da massa do adsorvente natural	62
5.2.5.	Estudo dos ciclos de extração	62
5.2.6.	Variação da quantidade de ciclos de extração com diferentes alíquotas	63
5.2.7.	Estudo da concentração de Cu(II)	64
5.2.8.	Eluente: concentração e volume e número de ciclos	65
5.3.	Resultados analíticos de validação.....	66
6.	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água usada no tratamento de diálise para os pacientes com Insuficiência Renal Crônica (IRC) é uma importante questão de saúde pública considerando o nível de exposição do paciente em tratamento, além do aumento da população mundial com IRC (8-16 %) que dependem de Terapias Renais Substitutivas (TRS). Pacientes em hemodiálise (HD) são expostos a 300 L de água por semana, entrando diretamente no sistema circulatório, via solução de diálise (dialisato) (SUZUKI *et al.*, 2019), o que torna essencial o controle de qualidade para garantir a eficiência do tratamento e a segurança do paciente (ALMODOVAR *et al.*, 2018).

Em 2013, a HD foi o tratamento mais escolhido (90%) para IRC na América Latina, sendo que 43% dos pacientes que optaram por este tratamento se encontravam no Brasil. Em 2016, no Brasil a estimativa foi de 122.825 pacientes em tratamento dialítico, dos quais 113.122 foram submetidos à HD realizada em 747 Serviços de Diálise no país (ALMODOVAR *et al.*, 2018). De acordo com censo brasileiro de diálise, realizado entre os anos de 2009-2018 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), nos últimos 10 anos houve um aumento de pacientes em programas de diálise crônica, correspondendo a um aumento médio anual de 5.587 pacientes. Em 2018 esse número chegou em 133.464 pacientes (NEVES *et al.*, 2020).

A HD é um procedimento de depuração do sangue, empregado no tratamento da deficiência renal, na forma crônica e aguda, onde o sangue do paciente em contato com o dialisato no dializador é purificado, retornando posteriormente à corrente sanguínea (SOUSA *et al.*, 2013; ALMODOVAR *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2019). A contaminação química (metais) e/ou microbiológica em HD pode ocorrer por meio da água tratada utilizada para diluição do dialisato, pelo concentrado polieletrólítico para hemodiálise (CPHD) ou até mesmo pela membrana semipermeável do dializador utilizada como filtro, além de outras fontes de contaminação.

O cobre é um elemento essencial para manutenção das funções biológicas de muitos organismos vivos, atuando como cofator em importantes enzimas no organismo humano (YABUTANI *et al.*, 2018; FARAJI *et al.*, 2019). Baixas concentrações de cobre pode ser contaminante em algumas matrizes, como na água para HD, cujo limite é de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANVISA, RDC 11:2014) e no álcool combustível, cujo limite é 70 $\mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP) (DO CARMO *et al.*, 2013), além de ser tóxico para os organismos marinhos (URBAN; ROMERO; CAMPOS, 2018). As exposições crônica de cobre e/ou em níveis acima do permitido na corrente sanguínea podem gerar efeitos adversos à saúde

humana e em pacientes em tratamento de HD (ANVISA, RDC 11:2014; ALMODOVAR *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2019).

As técnicas analíticas utilizadas para determinação de cobre são espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) (BERKDEMIR *et al.*, 2019), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) (NERI *et al.*, 2019), espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) (PALUCH *et al.*, 2018), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP – MS) (SUZUKI *et al.* 2019), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP – OES) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018), além de técnicas eletroanalíticas tais como: potenciometria de redissolução anódica (ROHANI *et al.*, 2019) e voltametria de redissolução catódica de onda quadrada (AL-RASHDI *et al.*, 2020).

Algumas dessas técnicas mencionadas pode não alcançar uma detecção adequada em níveis traços e/ou dependendo da complexidade da matriz, sendo necessário o preparo de amostra para pré-concentração e/ou eliminação de interferentes de matriz (DIAS *et al.* 2020; NERI *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2011). Outras com maior sensibilidade, tal como ICP – OES/MS a determinação direta de cobre, apesar de apresentarem alta sensibilidade, podem não ser acessíveis na maioria dos laboratórios de rotina.

As técnicas de preparo de amostras para extração e pré-concentração como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) aumentam a seletividade e sensibilidade (DIAS *et al.* 2020). Nas últimas décadas, uma variedade de técnicas de preparo de amostra tem sido desenvolvida com foco na miniaturização desses processos afim de minimizar desvantagens tais como: consumo de solventes tóxicos, geração de grande quantidade de resíduos e o uso de altos volumes de amostra (JARDIM, 2015).

Nesse cenário, a Extração em Ponteiras Descartáveis (DPX - *Disposable Pipette Extraction*) vem se destacando como uma miniaturização da SPE convencional, sendo um tipo de extração em fase sólida, combinando algumas das vantagens da SPE tradicional e apresentando novos recursos (CADORIM *et al.*, 2019). O dispositivo DPX se baseia em ponteira, com capacidade de 1 a 5 mL, com uma pequena quantidade de sorvente contido entre dois filtros (BORDIM *et al.*, 2016; PINTO; QUEIROZ, 2015). O dispositivo está disponível comercialmente, entretanto sua aquisição inclui custos de importação além de ser pouco difundido. Este dispositivo também pode ser adaptado para uso de ponteiras comumente utilizadas em micropipetas, como forma de facilitar a abrangência da DPX.

A extração em fase sólida por meio da técnica DPX tem sido reportada com muitas aplicações na determinação de diversos compostos orgânicos. No entanto, esse número não é

tão expressivo quanto ao uso da DPX em determinações de íons metálicos. A literatura mostra que os avanços desta técnica, na investigação científica, tem sido direcionado ao uso de sorventes cada vez mais diversificados, explorando as propriedades dos materiais sintéticos e naturais, os avanços das técnicas analíticas e da química dos materiais visando custo, seletividade, miniaturização, redução e/ou aproveitamento de resíduos para extração, concentração de analitos e/ou limpeza da amostra.

O emprego de diferentes materiais adsorventes como fases sólida demonstram a versatilidade e aplicação da DPX com bons resultados analíticos para diversos compostos e matrizes. O uso de materiais naturais como fase sólida no DPX pode ser uma alternativa de baixo custo considerando que os adsorventes naturais tem sido empregado com sucesso na adsorção de vários íons metálicos (DO CARMO *et al.*, 2019, ALVES *et al.*, 2017). Acheampong e colaboradores (2011) estudou a biosorção de cobre para quatro sorventes naturais tendo como melhores resultados a casca de coco e as semente de *Moringa oleifera*.

As sementes de *Moringa oleifera* na forma de pó, devido a sua alta capacidade adsorptiva, tem sido explorada e mostrado um bom potencial em procedimentos de remoção e extração/pré-concentração de vários metais, além do baixo custo e facilidade de obtenção (ALVES *et al.*, 2010; ALVES; COELHO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cobre

O cobre é um elemento químico encontrado na natureza em uma variedade de compostos orgânicos, sais minerais e na forma metálica (BARCELOS, 2008). Este elemento apresenta-se em quatro estados de oxidação, como: cobre metálico Cu^0 , íon cuproso Cu^+ , íon cúprico Cu^{2+} e íon cobre trivalente Cu^{3+} , além, da forma organometálica (BARCELOS, 2008; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012).

O cobre metálico (Cu^0) é estável, pouco solúvel em água, em soluções salinas e em soluções ligeiramente ácidas, mas pode ser dissolvido em ácido nítrico e ácido sulfúrico, bem como em soluções básicas de hidróxido de amônio, carbonato de amônio e cianeto, na presença de oxigênio (EHC 200, 1998). O íon Cu^+ é instável e oxida com facilidade formando o íon Cu^{2+} , por qualquer oxidante e/ou em uma reação de desproporção (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012), a menos que seja estabilizado pela formação de complexos (EHC 200, 1998). Em geral, sais de cobre +1 são insolúveis, diamagnéticos e apresentam coloração branca (LEE, 2000 *apud* RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012).

O cobre +2 é o estado de oxidação mais comum nos compostos (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012) e o mais importante em ambientes aquáticos, além de ser predominante em sistemas biológicos (BARCELOS, 2008). No entanto, o estado de oxidação +1 também pode ser encontrado nesses ambientes, apesar de ser instável (BARCELOS, 2008; YABUTANI *et al.*, 2018). Muitos compostos de cobre +2, como os sais e complexos, tendem a ser solúveis em água, são paramagnéticos e coloridos (coloração azul-verde) (EHC 200, 1998; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). Em águas naturais, a maior parte do cobre dissolvido (> 99 %) está na forma complexada com ligantes inorgânicos e orgânicos, sendo que apenas parte deste cobre naturalmente complexado é disponível para a biota (URBAN; ROMERO; CAMPOS, 2018). O íon Cu^{2+} liga-se preferencialmente, através do oxigênio, a ligantes inorgânicos (H_2O , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , etc) e a ligantes orgânicos através de grupos fenólicos e carboxílicos (BARCELOS, 2008). Nos meios ambientais e minerais, o estado de oxidação divalente (Cu^{2+}) é facilmente adsorvido a uma variedade de óxidos metálicos hidratados, incluindo os de ferro, alumínio e manganês (EHC 200, 1998). A forma trivalente de cobre (Cu^{3+}) é rara, estando presente em poucos compostos, que geralmente são fortes agentes oxidantes (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012).

Em condições padrão, o cobre não está sujeito a oxidação pelos íons hidrogênio, justificando o seu uso em ornamentos. Logo, em temperaturas mais elevadas o cobre reage com oxigênio formando óxido de cobre +1 ($\text{CuO}_{(s)}$) e +2 ($\text{Cu}_2\text{O}_{(s)}$) (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012).

Algumas características químicas e físico-químicas do cobre e alguns sais de cobre estão descritas na Tabela 1, tais como: fórmula molecular, configuração eletrônica, massa molar relativa, solubilidade em água, pontos de fusão e ebulição.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do cobre e alguns sais de cobre^a.

	Cobre metálico	Sulfato de Cobre (II)	Óxido Cuproso (I)	Hidróxido de Cobre (II)	Cloreto de Cobre (II)
Fórmula Molecular	Cu	CuSO_4	Cu_2O	$\text{Cu}(\text{OH})_2$	CuCl_2
Massa Molar relativa	63,55	159,6	141,3	97,56	134,45
Ponto de ebulição (°C)	2567	Decompõem-se em CuO a 650°C	-	Decompõem-se a 140 °C	Decompõem-se a 993 °C
Ponto de fusão (°C)	1083,4	Decompõem-se ligeiramente a > 200°C	1235	Decompõem-se	620
Solubilidade em água	Insolúvel	143 g L ⁻¹ a 0°C	Praticamente insolúvel	2,9 mg L ⁻¹ a 25°C	706 g L ⁻¹
Configuração eletrônica		Cu^0 $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4p^1$	Cu^{+1} $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10}$	Cu^{+2} $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^9$	

Adaptado de Environmental Health Criteria 200 (EHC), 1998.

^a Lide & Frederikse (1993) *apud* EHC 200, 1998.

Os minérios de cobre são extraídos, fundidos e refinados para produzir muitos produtos industriais e comerciais. O cobre é muito utilizado na galvanoplastia, na produção de fios elétricos e utensílios de cozinha, na microeletrônica, na fotografia, como material de telhados, em sistemas internos, canalizações (sistemas de distribuição de água) e como catalisador na indústria química (BARCELOS, 2008; COSTA *et al.*, 2013). O cobre está presente nos inseticidas, fungicidas, tintas, como micronutriente em fertilizantes, na alimentação animal, bem como no controle de doenças em animais e aves (EHC 200, 1998; COSTA *et al.*, 2013; SHAIKH, *et al.*, 2016).

Fontes naturais de exposição de cobre incluem poeira suspensas pelo vento, vulcões, vegetação em decomposição, incêndios florestais e spray marítimo. Emissões antropogênicas

incluem fundições de ferro, usinas de energia e fontes de combustão, como as incineradoras municipais. A grande liberação de cobre para a terra é de rejeitos e sobrecarga de minas de cobre e lodo de esgoto. O uso agrícola de produtos de cobre representa 2% do cobre liberado (EHC 200, 1998).

O cobre é um elemento essencial para a manutenção das funções biológicas de todos os organismos vivos, desde bactérias até seres humanos (YABUTANI *et al.*, 2018, BARCELOS, 2008). No organismo humano, o cobre é um micronutriente que participa de várias funções fisiológicas, com uma incorporação específica em um grande número de proteínas estruturais e enzimáticas (cofator em no mínimo 30 enzimas importantes (BARCELOS, 2008; URBAN; ROMERO; CAMPOS, 2018; FARAJI *et al.*, 2019). Entre as funções essenciais do cobre no organismo humano pode-se ressaltar: transporte de elétrons, metabolismos do oxigênio e do ferro, síntese de melanina, formação de ossos, de colágeno e de hemoglobina, além de outras contribuições (BARCELOS, 2008; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012; CASTILLO-CASTAÑEDA *et al.*, 2019). Nos animais de sangue verde, tais como: o polvo e alguns artrópodes, o cobre atua no transporte de oxigênio através do sangue (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). Nas plantas o cobre é um elemento vital à níveis traço (EHC 200, 1998).

O íon cobre (II) é um dos metais traço mais abundantes no organismo humano (depois do ferro e do zinco), estando distribuído no corpo todo, principalmente em órgãos com atividade metabólica intensa, como nos rins e no fígado, região que se obtém as maiores concentrações de cobre em adultos (12 e 6,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). A bilis é o fluído corporal com maior concentração de cobre, contribuindo com uma secreção diária de 2,5 mg de cobre no tubo digestivo, o qual não é reabsorvido (BARCELOS, 2008). A excreção de cobre pela bÍlis é extremamente importante para o controle de níveis hepáticos de cobre (TURNLUND, 1998 *apud* BARCELOS, 2008). O homem necessita de um ingestão de 2 a 5 mg de cobre por dia (BARCELOS, 2008) .

A alimentação, via oral, é a maior fonte de incorporação de cobre no organismo humano, sendo que este micronutriente está presente na maioria dos alimentos, assim como contaminante na água. Nos alimentos, as maiores concentrações de cobre estão disponíveis nos peixes, tais como: atum e camarão (0,1-1,2 e 2,0-2,9 mg Kg^{-1} , respectivamente), nos frutos secos, tais como: amendoim, amêndoa e nozes (2,7-9,6; 9,7-13,6 e 2,0-13,9 mg Kg^{-1} , respectivamente), nos cereais, tais como: trigo, milho e arroz (3,3-36,0; 0,6-16,6 e 0,6-3,1 mg kg^{-1} , respectivamente), em fígados bovino e de cordeiro (157 e 56 mg Kg^{-1} , respectivamente). As frutas, os vegetais, os leites humano e de vaca, entre outros alimentos, também apresentam doses significativas de cobre em concentrações entre mg Kg^{-1} e $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (BARCELOS, 2008).

Outras vias de ingestão e absorção de cobre podem ocorrer por meio do solo contaminados e/ou por absorção pele (NERI *et al.*, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda doses de ingestão diária mínimas e máximas de cobre, outros nutrientes, substâncias bioativas e enzimas em suplementos alimentares (ANVISA, 2018). A Tabela 2 apresenta a quantidade mínima e máxima de ingestão diária de cobre em suplementos alimentares para lactentes de 0 a 6 meses, crianças de primeira infância de 1 a 3 anos, crianças de 4 a 8 anos, indivíduos de 9 a 18 anos, adultos maiores que 18 anos, gestantes e lactantes.

Tabela 2: Ingestão diária de cobre recomendada em suplementos alimentares (ANVISA, 2018).

	0 – 6 meses	>6 – 12 meses	>1 – 3 anos	4 a 8 anos
Lim.min.	N.A	33 µg	51 µg	66 µg
Lim. Máx.	N.A	-	660 µg	2560 µg
	9 a 18 anos	>18 anos	Gestantes	Lactantes
Lim.min.	133,5 µg	135 µg	150 µg	195 µg
Lim. Máx.	3960,51 µg	8975,52 µg	6935,01 µg	7036,33 µg

N.A = Proibição de uso

A deficiência de cobre pode gerar problemas à saúde humana tais como: anemia, anormalidades ósseas, danos celulares, entre outros (BARCELOS, 2008; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). Segundo autores supracitados, a deficiência de cobre ocorre com mais frequência em recém-nascidos prematuros, por possuírem fígados relativamente pequenos e grande necessidade de cobre, devido ao crescimento. Com a deficiência de cobre, é comum ocorrerem anomalias ósseas, principalmente em crianças (BARCELOS, 2008).

Por outro lado, a exposição crônica de cobre pode causar doenças neurológicas, depressão, autismo e anemia (BREWER *et al.*, 2012; GAETKE; CHOW-JOHNSON; CHOW, 2014; SUZUKI *et al.*, 2019). Indivíduos com doença hepática crônica e pacientes em hemodiálise são potencialmente sensíveis ao excesso de cobre (EHC 200, 1998).

O cobre presente no solo em níveis elevados pode ser extremamente tóxico para as plantas (queda das folhas e coloração clorótica, entre outros) (EHC 200, 1998). Em baixas concentrações, o cobre pode ser tóxico para os organismos marinhos, sendo que o grau de toxicidade e as funções bióticas (com por ex.: a taxa de captação celular), dependem do estado de oxidação e do tipo de ligante que está complexado (URBAN; ROMERO; CAMPOS, 2018; YABUTANI *et al.*, 2018).

A presença de cobre em baixas concentrações pode ser contaminante em níveis acima do permitido em algumas matrizes. A ANP estabelece uma concentração máxima de cobre no

álcool combustível de $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ (DO CARMO *et al.*, 2013). O nível de cobre permitido em água para HD está descrito no item 2.2.

2.2. Água para hemodiálise

A IRC refere-se a perda progressiva e irreversível das funções dos rins para eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo organismo que se acumulam no sangue (ALMODOVAR *et al.*, 2018). Em estágios mais avançados da IRC pacientes podem depender de TRS, nas modalidades de HD, diálise peritoneal ou transplantes (CUSUMANO *et al. apud* ALMODOVAR *et al.*, 2018).

A HD é um procedimento de purificação do sangue por meio de uma máquina de diálise que remove substâncias que podem ser tóxicas ao organismo, tais como: creatinina, uréia, excesso de líquidos e de sais minerais, promovendo o balanço eletrolítico do organismo (SOUSA *et al.*, 2013; THOMÉ *et al.*, 1999 *apud* CONRADO, 2019). Esse procedimento ajuda no controle da pressão arterial e manutenção do equilíbrio de substâncias como sódio, potássio, ureia e creatinina (SBN, 2020).

No procedimento de HD o sangue do paciente via acesso vascular (um catéter ou uma fístula arteriovenosa) é transportado por um sistema de circulação extracorpórea impulsionado por uma bomba até um filtro capilar (dializador). No dialisador ocorre a transferência de solutos entre o sangue e a solução de diálise (dialisato) através de uma membrana semipermeável artificial (filtro de hemodiálise ou capilar), e posteriormente o fluido depurado retorna para o corpo pelo acesso vascular (SOUSA *et al.*, 2013; SBN, 2020).

O procedimento de transferência de solutos entre o sangue e o dialisato em HD pela membrana semipermeável ocorre por três mecanismos tais como: a difusão, a ultrafiltração e a convecção (NASCIMENTO; MARQUES, 2005; COSTA *et al.*, 2020; ALMODOVAR *et al.*, 2018). A difusão é a migração do soluto conforme o gradiente de concentração, do maior para o menor estágio de concentração. A ultrafiltração é a remoção de líquidos através de um gradiente de pressão hidrostática e a convecção é a perda de solutos durante o arraste de solutos na mesma direção do fluxo de líquidos através da membrana (NASCIMENTO; MARQUES, 2005).

A água é o principal componente no tratamento de diálise para os pacientes com IRC (SINOTI, 2010). Em geral, pacientes em tratamento de HD são expostos a 300 L de água por semana (SUZUKI *et al.*, 2019; ALMODOVAR *et al.*, 2018), o que torna essencial o controle de qualidade para garantir a eficiência do tratamento e a segurança do paciente (ALMODOVAR

et al., 2018). A água não tratada corretamente, expõe o paciente a contaminantes químicos, bacteriológicos (tóxicos), levando ao aparecimento de efeitos adversos, muitas vezes letais (SINOTI, 2010).

A água para HD é obtida pelo tratamento de água potável pelo sistema de tratamento e distribuição de água para HD tornando-a apta para o uso em procedimento hemodialítico (ANVISA, RDC 11:2014). As amostras de água para HD para análises físico-químicas devem ser coletadas em ponto após o subsistema de tratamento de água para HD e analisadas pelo laboratório licenciado junto ao órgão sanitário competente (ANVISA, RDC 11:2014).

O padrão de qualidade da água para HD deve apresentar conformidade com os critérios estabelecidos pela ANVISA (ANVISA, RDC 11:2014). No âmbito internacional, existem organizações como The Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) (BRAIMOHT *et al.*, 2012) e The United States Pharmacopeia Guidelines (ABUALHASAN *et al.*, 2018) que estabelecem padrões sobre a qualidade dos serviços de diálise.

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA), a AAMI e The The United States Pharmacopeia Guidelines o limite de cobre na água utilizada não pode ultrapassar $100 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que, no Brasil o monitoramento da água para HD deve ocorrer semestralmente (Tabela 3).

Tabela 3: Padrão de qualidade da água para hemodiálise (ANVISA, RDC 11:2014).

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de análise
Coliforme total	Ausência em 100 mL	Mensal
Contagem de bactérias heterotróficas	100 UFC/mL	Mensal
Endotoxinas	0,25 EU/mL	Mensal
Alumínio	0,01 mg L ⁻¹	Semestral
Arsênio	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Bário	0,1 mg L ⁻¹	Semestral
Berílio	0,0004 mg L ⁻¹	Semestral
Cádmio	0,001 mg L ⁻¹	Semestral
Cálcio	2 mg L ⁻¹	Semestral
Chumbo	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Cloro total	0,1 mg L ⁻¹	Semestral
Cobre	0,1 mg L ⁻¹	Semestral
Cromo	0,014 mg L ⁻¹	Semestral
Fluoreto	0,2 mg L ⁻¹	Semestral
Magnésio	4 mg L ⁻¹	Semestral
Mercúrio	0,0002 mg L ⁻¹	Semestral
Nitrato (N)	2 mg L ⁻¹	Semestral
Potássio	8 mg L ⁻¹	Semestral
Prata	0,005 mg L ⁻¹	Semestral
Selênio	0,09 mg L ⁻¹	Semestral
Sódio	70 mg L ⁻¹	Semestral

Sulfato	100 mg L ⁻¹	Semestral
Tálio	0,002 mg L ⁻¹	Semestral
Zinco	0,1 mg L ⁻¹	Semestral

A água tratada para HD é usada para diluir o CPHD contendo íons cálcio, potássio, sódio, magnésio, acetato, com ou sem glicose, que após diluído compõe a solução de diálise (dialisato) (SINOTI, 2010; ANVISA, RDC 11:2014).

O dialisato pode apresentar composição e concentração variada de acordo com circunstâncias clínicas especiais. No entanto, os componentes comuns do dialisato são a água e os solutos, tais como: sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloro, bicarbonato, acetato, dextrose, dióxido de carbono, entre outros (NEFROCOR, 2020, MCGILL; WEINER, 2017; SARGENT *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020). Normalmente o dialisato se assemelha ao plasma do indivíduo normal (NEFROCOR, 2020).

O dialisato é uma solução não estéril, portanto a composição química e microbiológica do dialisato pode atravessar a membrana do dializador (membrana semipermeável) podendo prejudicar à saúde dos pacientes em diálise (WARD RA, 2009 *apud* ABUALHASAN *et al.*, 2018; HOENICH *et al.*, 2010 *apud* COSTA *et al.*, 2020). A membrana dentro do dializador constitui uma barreira entre o sangue do paciente e o fluido, sendo que a retenção de partículas é limitada pelo tamanho do contaminante (PASMORE; MARION, 2009 *apud* COSTA *et al.*, 2020).

A contaminação da água utilizada pode ocorrer por metais e/ou agentes microbiológicos através do uso de fontes inapropriadas de água, problemas no sistema do tratamento de distribuição de água ou falhas na manutenção ou limpeza dos equipamentos de hemodiálise (SUZUKI *et al.*, 2019), entre outros.

2.3. Métodos analíticos de detecção e quantificação de cobre

Técnicas de preparo de amostras e instrumentação analítica tem sido desenvolvidas, favorecendo a sensibilidade, permitindo métodos analíticos rápidos, com alta frequência analítica (PINTO; QUEIROZ, 2015). A obtenção de dados coerentes frente a contaminação das amostras tem sido uma preocupação mesmo após o desenvolvimento de instrumentos, de métodos analíticos suficientemente sensíveis e de reagentes ultra purificados para a análise de metais traços (< 50 nmol kg⁻¹) (CAMPOS; VIEL, 2002).

Os metais pesados estão entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes do ambiente aquático (CAMPOS; VIEL, 2002), não podendo ser degradados ou destruídos (ACAR; EREN, 2006 *apud* FLECK; TAVARES; EYNG, 2013), sendo necessário o monitoramento e controle da contaminação destes ambientes (CAMPOS; VIEL, 2002).

De acordo com Campos e Viel (2002), a necessidade de utilizar procedimentos com baixo risco de contaminação na determinação de metais traços são imprescindíveis nos estudos envolvendo águas de oceanos, onde nestas são encontradas concentrações de metais pesados muito baixas. Esta preocupação é estendida também em águas de rios, lagos e estuários, onde pode haver concentrações mais elevadas de metais.

A contaminação de amostras com cobre pelo ar, poeira, reagentes e amostragem é uma das principais fontes de erros analíticos (EHC 200, 1998). Somente após a conscientização de que a amostragem, preservação e manuseio das amostras antes da análise podiam representar maiores fontes de erro que a própria análise química, é que foram publicados, em 1977 e em 1981, os primeiros dados confiáveis da distribuição de cobre e chumbo, respectivamente, em águas de oceano aberto (CAMPOS; VIEL, 2002).

Métodos colorimétricos e gravimétricos para determinação de cobre são simples e baratos. Contudo, esses métodos apresentam limitações para concentrações muito baixas (EHC 200, 1998). Essas limitações podem ser supridas por meio da adição de uma etapa de pré-concentração antes da detecção final. Nesse sentido, a combinação de técnicas de preparo de amostras com técnicas instrumentais tem sido muito utilizada para determinação de cobre em diversas matrizes. A Tabela 4 apresenta a pré-concentração de cobre e detecção por diferentes técnicas instrumentais, como a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) combinada com a UV-Vis, em amostras de águas e alimentos (FARAJI *et al.*, 2019), assim como a SPE combinada com espectroscopia de infravermelho (IMRAM *et al.*, 2019), em amostras de águas.

Em casos de baixas concentrações de cobre, as técnicas espectrofotométricas de absorção atômica (AAS) são mais amplamente utilizados em inúmeras matrizes (EHC 200, 1998). A F AAS tem uma sensibilidade inferior do que a ET AAS e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), porém possui outras vantagens como facilidade de operação e menor custo instrumental (ROLDAN; KRUG; NÓBREGA, 2006). A Tabela 4 apresenta também técnicas de pré-concentração de cobre e detecção por AAS, como a SPE online com injeção em fluxo (FIA) acoplada ao F AAS, em amostras de leite (SUQUILA; TARLEY, 2019), a SPE com fase sólida de *Coprinus atramentaria* acoplada ao F AAS (ERBAS *et al.*, 2019), um nanosorvente (PmPDA/CNT) para a Microextração de Filme Fino

(TFME) acoplada ao F AAS, para amostras de água e alimentos (MEHRANI *et al.*, 2019) e a Microextração em Gota Única (SDME) acoplada ao GF AAS (NERI *et al.*, 2019).

Tabela 4: Comparação de diferentes metodologias para pré-concentração de cobre em diferentes matrizes.

Adsorvente	Técnicas de pré-concentração e detecção	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fator de pré-concentração	R.S.D (%)	Recovery (%)	Samples	Reference
-	SDME e GF AAS	0,025	45,2	6,77	86,7 – 102,8	Água Potável	NERI <i>et al.</i> , 2019
Activated carbon@Fe/Mn/O composite	dSPE e FAAS	0,46	33,3	1,3 – 3,3	90 - 97%	Água Potável, Águas residuais	BERKDEMIR <i>et al.</i> , 2019
-	DLLME e UV-Vis	0,3	92	3,5	97,4 – 105,8	Água e alimento	FARAJI <i>et al.</i> , 2019
IIP-HEMA-BSA	SPE online e FIA-FAAS	1,1	24	4,0 – 8,6	96,4 – 113,4	Leite	SUQUILA & TARLEY, 2019
Pyl-SBA-15	SPE e Infrared Spectrophometer	0,38	66,6	< 5	98,30 – 99,50	Água	IMRAM <i>et al.</i> , 2019
<i>Coprinus atramentaria</i>	SPE e FAAS	0,7	70	5,15 – 5,31	89 - 100	Cabelo e Água Potável	ERBAS <i>et al.</i> , 2019
PmPDA/CNT	TFME e FAAS	0,32	76,7	2,9 – 3,7	85 - 102	Alimentos e Água	MEHRANI <i>et al.</i> , 2019
Polpa de sementes de <i>Moringa oleifera</i> “in natura”	DPX e FAAS	0,64	50	6,2 e 7,8	92,9 – 100,5	Água para hemodiálise	Este estudo

Técnicas de emissão, como a ICP-OES (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018) ou a ICP-MS (SUZUKI *et al.* 2019) permitem alcançar sensibilidades ainda maiores (EHC 200, 1998). Essas técnicas permitem determinações diretas da amostra, não há a necessidade de um pré-tratamento, em contrapartida são mais caras e exigem habilidades operacionais do analista. Como exemplo, Suzuki e colaboradores (2019) realizaram a determinação direta de cobre em amostras de água para hemodiálise por ICP-MS, com LD $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ e Peixoto e colaboradores (2019) determinaram cobre por ICP-MS em amostras de leite materno, após mineralização ácida assistida por radiação microondas, com LD de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Outras metodologias para determinação de cobre podem ser encontradas, tais como: fluorescência de raios-X, voltametria de redissolução catódica de onda quadrada (AL-RASHDI *et al.*, 2020) e potenciometria de redissolução anódica (ROHANI *et al.*, 2019). Urban, Romero e Campos (2018) determinaram cobre total dissolvido e cobre lábil em águas naturais por meio de um sensor portátil pré-concentrando o analito mergulhando o eletrodo modificado na amostra.

2.4. Técnicas de Preparo de Amostras: Extração em Fase Sólida (SPE) e Disposable Pipette Extraction (DPX)

Nos últimos anos, a química analítica tem sido direcionada para a simplificação através da miniaturização dos sistemas analíticos, tendo como destaque as técnicas de preparo de amostras, afim de minimizar desvantagens tais como: consumo de solventes tóxicos, geração de grande quantidade de resíduos e o uso de altos volumes de amostra (JARDIM, 2015).

A etapa do preparo de amostra é a primeira e a etapa mais dispendiosa durante o processo de análise. Esta etapa requer 80% do tempo total da análise e tem como objetivo o isolamento seletivo, a concentração de analitos (níveis traço) e/ou a eliminação de grande parte dos interferentes de matriz (PINTO; QUEIROZ, 2015). A extração líquido-líquido (LLE), a precipitação de proteínas de fluidos biológicos (PP) e a extração em fase sólida (SPE) são exemplos de técnicas de preparo de amostras convencionais (PINTO; QUEIROZ, 2015).

A SPE é uma técnica de extração por sorção introduzida no início dos anos 1970 e está disponível comercialmente desde 1978, na forma de cartuchos descartáveis para suprir as desvantagens da LLE, tais como a separação incompleta das fases; as baixas porcentagens de recuperação e o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos (JARDIM, 2015). A SPE e LLE aumentam a seletividade e sensibilidade (DIAS *et al.* 2020). A SPE apresenta como desvantagem o tempo de análise elevado, os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias (JARDIM, 2015). O autor supracitado ressalta, que os cartuchos são utilizados uma única vez e, geralmente há baixa reprodutibilidade entre fabricantes e também entre lotes.

A SPE tem sido uma das técnicas mais utilizadas no preparo de amostras em análises ambientais, farmacêuticas e de alimentos, nas quais os analitos se encontram em níveis traços ($\mu\text{g Kg}^{-1}$ a ng Kg^{-1}), podendo ser usada para quatro importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento do analito, isolamento da matriz ou limpeza da amostra (*clean-up*) e estocagem da amostra (JARDIM, 2015).

A DPX é uma versão miniaturizada da SPE convencional combinando algumas das vantagens da SPE e apresentando novos recursos (CADORIM *et al.*, 2019). As vantagens da DPX incluem rápida extração de analitos, boas recuperações, quantidade reduzida de solventes, baixo consumo de amostras e a possibilidade de automação (PINTO; QUEIROZ, 2015, CADORIM *et al.*, 2019, JARDIM, 2015).

A DPX é um sistema único e patentado (nº US6566145 B2) em 2003 desenvolvido pelo professor William B. Brewer (Ph. D da Universidade da Carolina do Sul, EUA), dono-

presidente da DPX Labs (JARDIM, 2015; PINTO; QUEIROZ, 2015). A técnica DPX foi automatizada pela GERSTEL usando Multi Purpose Sampler MPS (JARDIM, 2015). Trata-se do uso de uma ponteira padrão de pipeta (1 ou 5 mL) modificada, na qual uma pequena quantidade de sorvente está contido em seu interior entre dois filtros e baseia-se no rápido equilíbrio de sorção do analito, devido à dispersão da fase sólida na solução/amostra (PINTO; QUEIROZ, 2015).

Os dispositivos DPX comerciais geralmente apresentam fases sólidas com materiais similares aos cartuchos SPE tradicionais com tipo de fases sólidas de estireno divinil benzeno (DPX-RP), a qual apresenta potencial para interações $\pi\pi$ e interações hidrofóbicas com analito e é comumente usada para adsorção de compostos apolares e pouco polares (em pesticidas, por exemplo), fase sólida de grupos poliamino (DPX-WAX), a qual é usada para interação com compostos ácidos (em drogas e metabólitos), fase de sílica gel (DPX-Si), usada para limpeza (*cleanup*) de amostras ambientais, fase de C18 (20 % de sílica gel) (DPX-C18), usada para remoção de interferentes de matrix (PINTO; QUEIROZ, 2015). Além desses tipos de ponteiras comercializadas e outras não citadas, existe uma versão isenta de fase sólida (DPX-blank), usada para o desenvolvimento de método (PINTO; QUEIROZ, 2015), muito utilizada em trabalhos reportados no meio científico.

A microextração em ponteiras DPX se dá em quatro etapas: (1) condicionamento da fase extratora com um solvente para ativação dos sítios de ligação (esta etapa pode não ser necessária); (2) aspiração da amostra líquida (extrato) para o interior da ponteira e mistura da mesma à fase extratora (adsorvente) por meio da aspiração de ar, formando uma suspensão (processo que permite uma rápida e eficiente extração), dispensando a amostra; (3) etapa de lavagem; (4) aspiração do solvente de eluição, seguido da aspiração de ar, várias vezes (até completa dessorção dos analitos). O eluato pode ser analisado diretamente ou evaporado e reconstituído (PINTO; QUEIROZ, 2015).

Nos últimos 10 anos, a extração por DPX tem sido reportada com muitas aplicações na determinação de diversos compostos orgânicos, tais como: pesticidas (CORAZZA *et al.*, 2019 e OENNING *et al.*, 2018; KONATU *et al.*, 2017), inseticidas (SONG *et al.*, 2018), fungicida (AGUIAR *et al.*, 2020), fármacos (MAFRA *et al.*, 2018), drogas de abuso (ELLISON *et al.*, 2009), contaminantes emergentes orgânicos (MORÉS *et al.*, 2019) em amostras com diferentes complexidades, tais como: amostras ambientais (CORAZZA *et al.*, 2019, MORÉS *et al.*, 2019; TURAZZI *et al.*, 2019; CORAZZA *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2013), amostras biológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2019; OENNING *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2017, BORDIM *et al.*, 2013; BREWER *et al.*, 2009; SCHROEDER *et al.*, 2008) e

amostras de alimentos (AGUIAR JÚNIOR *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2018; KONATU *et al.*, 2017; GUAN *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2014). No entanto, esse número não é tão expressivo quanto ao uso da DPX em determinações de metais, sendo encontradas publicações envolvendo a determinação de paládio em resíduos líquidos (JAILSON *et al.*, 2012) e determinações de chumbo e cádmio em águas naturais como mangue, riacho e mar (CADORIM *et al.*, 2018).

Corazza e colaboradores (2019) desenvolveram uma metodologia usando o DPX-WAX (comercial) para separação e concentração de 12 pesticidas, com propriedades químicas diferentes, em água potável e detecção por HPLC-DAD, com LQs que variaram de 0,06 µg L⁻¹ para carbofurano até 2,30 µg L⁻¹ para carbendazim, usando baixo volume de solvente (100 µL) e de fase sólida (20 mg).

Aguiar Júnior e colaboradores (2020) desenvolveram um sorvente para extração seletiva de carbendazim em suco de laranja, por meio do processo de imobilização térmica depositando um polímero (glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano - PGDMS) em sílica, e utilização no dispositivo de ponteiros DPX. De acordo com os autores supracitados, o procedimento de preparo de amostra foi rápido (3 min), isento da limpeza da amostra, usando 150 mg de sorvente, 1,5 mL de amostra e 1,5 mL de metanol acidificada com 1% de HNO₃, com boa recuperação (105 % ± 3 %) e precisão, alcançando LQ de 0,033 µg mL⁻¹.

Outros trabalhos foram propostos por Cadorim e colaboradores (2018) e Morés e colaboradores (2019) que desenvolveram metodologias analíticas de pré-concentração e determinação de metais (Pb e Cd) por HR-CS GF AAS e extração e determinação de contaminantes emergentes orgânicos por HPLC-DAD, ambos com o uso do biosorvente de cortiça como fase extratora no DPX obtendo bons resultados de desempenho analítico.

2.5. Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck

A espécie *Moringa oleifera* Lamarck é uma planta pertencente à família Moringaceae que tem origem reportada, ainda que duvidosa, em Agra e Oudh, região noroeste da Índia, sul do Himalaia (PEREIRA, 2015). O desconhecimento da origem exata dessa espécie atribuiu-se pelo seu cultivo generalizado desde os tempos remotos (FOIDL *et al.*, 2001 *apud* PEREIRA, 2015), sendo classificada pelo pesquisador francês Jean Baptiste Antonine Pierre de Monet de Lamarck (1744 – 1829) (ARAÚJO, 2009).

A *Moringa oleifera* Lamarck é classificada taxonomicamente como: Reino: Plantae, Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Subclasse: Dilleniidae, Ordem: Capparidales,

Família: Moringaceae, Gênero: *Moringa*, Espécie: *Moringa oleifera* Lamarck (CYSNE, 2006 *apud* ARAÚJO, 2009).

Dentre as espécies pertencentes à família Moringaceae a *Moringa oleifera* Lamarck é a mais conhecida e cultivada, que se difundiu por todo o mundo, principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical (FAHEY, 2005 *apud* PEREIRA, 2015). A família Moringaceae (único gênero) apresenta 13 espécies diferentes, tais como: *Moringa oleifera* Lamarck, *M. arborea*, *M. borziana*, *M. concanensis*, *M. drouhardii*, *M. hildebrandtii*, *M. longituba*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. pygmaea*, *M. rivaie*, *M. ruspoliana* e *M. stenopetala* (TREES FOR LIFE, 2005 *apud* PEREIRA, 2015).

No mundo, a *Moringa oleifera* Lamarck é tolerante à seca e tem boa adaptação ao semi-árido (COSTA *et al.*, 2013), sendo introduzida em todas as regiões tropicais, semi, semi-áridas e úmidas do mundo (ARAÚJO, 2009), sendo distribuída na Índia, Egito, Filipinas, Ceilão, Tailândia, Paquistão, Jamaica, Nigéria, entre outras regiões do mundo (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980). Atualmente, se tornou típica de muitas regiões tropicais sendo uma importante cultura em países como Etiópia, Filipinas, Sudão, África Oriental, Ocidental e do Sul, Ásia tropical, América Latina, Caribe, Flórida e Ilhas do Pacífico (FAHEY, 2005 *apud* PEREIRA, 2015).

No Brasil, a *Moringa oleifera* Lamarck foi a primeira espécie da família Moringaceae a ser introduzida, por volta dos anos 1950, sendo utilizada inicialmente somente na ornamentação de parques público, devido à sua beleza natural e pelo desconhecimento da sua utilidade culinária (KERR; SILVA, 1999 *apud* ARAÚJO, 2009). A espécie foi reintroduzida, no Brasil, sendo reconhecida, como a introdução científica, em 1982, quando a Universidade do Maranhão recebeu 40 sementes de *Moringa oleifera* Lamarck, resultando em 25.000 árvores plantadas por estudantes em 9.000 casas de operários no estado do Maranhão (MORTON, 1991 *apud* ARAÚJO, 2009).

A *Moringa oleifera* Lamarck também é conhecida como Lírio-Branco ou Quiabo-de-Quina (Brasil), Paraíso Branco (Guatemala), Morunga (Honduras), Drumstick Tree ou Horseradish Tree (Estados Unidos), Árvore do Bem (França), Sajna (Índia), entre outros (PEZZAROSSO, 2004 *apud* ARAÚJO, 2009).

As sementes da *Moringa oleifera* Lamarck (acondicionadas no interior das vagens ou frutos em conchas fechadas triangularmente) são redondas ou triangulares, escuras por fora e contêm

no seu interior um núcleo constituído de uma massa branca e oleosa, encoberto por uma concha e medindo até 1 cm de diâmetro (LORENZI; MATOS, 2002 *apud* PEREIRA, 2015).

A Figura 1 apresenta a árvore e algumas partes da *Moringa oleifera* Lamarck. A Moringa é uma planta muito versátil e suas partes possui muitas aplicações: folhas (verdes e secas), flores (néctar e inteiras), vagens ou frutos [inteiras verdes, conchas e sementes (cascas ou tegumento do núcleo, óleo e torta)], galhos, caules, raízes (inteiras e cascas). As aplicações são variadas, as folhas verdes são empregadas como biomassa, suplemento alimentar animal, medicina, alimentação humana, as folhas secas são usadas em medicina e suplemento alimentar humano, o tegumento do núcleo ou cascas das sementes são utilizados como biocombustíveis e carvão ativado, o óleo das sementes podem ser aplicados em biocombustíveis, alimentação humana, medicina (PEREIRA, 2015), além de lamparinas, fabricação de sabão e lubrificação de pequenas engrenagens, como relógio (COSTA *et al.*, 2013), a torta das sementes tem aplicações em tratamentos de águas brutas e de efluentes, biofertilizante e alimentação animal, as raízes inteiras empregadas na alimentação humana, as conchas ou cascas das vagens podem ser aplicadas como adsorvente, carvão ativado, biocombustíveis (PEREIRA, 2015), além da utilização das sementes trituradas na purificação de água e outras aplicações (COSTA *et al.*, 2013) (Figura 1).

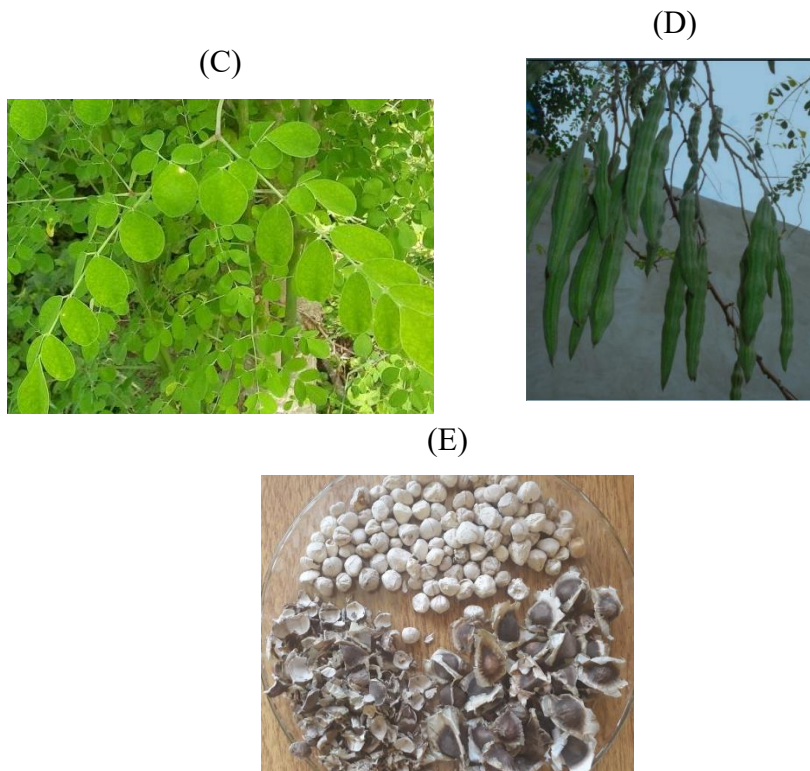
Figura 1: (A) Árvore de *Moringa oleifera*. Fonte: ALVES, 2013. Foto: Almeida, I. L. S., Uberlândia, 2010 (B) Raiz de *Moringa oleifera*. Fonte: Raiz da Moringa. Disponível em: <https://amarnatureza.org.br/raiz-da-moringa/>. Acesso em: 15 set. 2020. (C) Folhas de *Moringa oleifera*. Fonte: EMBRAPA, Foto: Nicoli Dichoff. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/19823237/moringa-para-todos-os-gostos>. Acesso em: 15 set. 2020. (D) Vagens de *Moringa oleifera*. Fonte: ALVES, 2013. Foto: Almeida, I. L. S., Uberlândia, 2010. (E) (I) Cascas, (II) Polpa e (III) Sementes integrais de *Moringa oleifera* Lam. Fonte: O Autor.

(A)



(B)





Desde o início dos anos 1970, as sementes de *Moringa oleifera* são investigadas no tratamento de água, sendo muito eficiente como coagulante e como agente antimicrobiano (KANSAL; KUMARI, 2014). Na África e nos países do sul da Ásia, o extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* tem sido usado como coagulante natural, cuja eficiência é semelhante aos sais de alumínio, para purificar água devido aos altos níveis de proteínas catiônicas ativas com massa molecular entre 6 e 16 KDa e pontos isoelétricos altamente alcalinos (FERREIRA *et al.*, 2008). No estado do Ceará, Brasil, a população recebe kits de Moringa com instruções para purificar a água, sendo que, para o preparo devem ser adicionadas três sementes moídas de Moringa em 1 L de água (GERDES, 1997).

As sementes de *Moringa oleifera* Lamarck na forma de pó, devido a sua alta capacidade adsorviva, tem sido explorada e mostrado um bom potencial em procedimentos de remoção, extração e pré-concentração de vários metais, além do baixo custo e facilidade de obtenção (ALVES *et al.*, 2010; ALVES; COELHO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017). As sementes de *Moringa oleifera* e seus derivados tem sido amplamente estudado pelo Laboratório de Espectroscopia Aplicada do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia com resultados satisfatórios (ALVES *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2011; DO CARMO *et al.*, 2013; ALVES; COELHO, 2013). Araújo e colaboradores (2010) avaliaram as propriedades da semente de *Moringa oleifera* como biosorvente com bons resultados de

remoção para chumbo, prata, cobre e cádmio (70 – 90 %). Alves e Coelho (2013) e Do Carmo e colaboradores (2019) demonstraram o potencial das cascas e das sementes de *Moringa oleifera* na extração seletiva de cromo e de manganês, respectivamente.

As sementes de *Moringa oleifera* apresenta uma composição com alto conteúdo de lipídeos e proteínas (ANHWANGE *et al.*, 2004 *apud* PALIWAL; SHARMA; PRACHETA, 2011). A presença significativa de proteínas totais ($383,0 \pm 13,0 \text{ g Kg}^{-1}$, matéria seca), lipídeos ($308 \pm 21,9 \text{ g Kg}^{-1}$ matéria seca) e carboidratos (165 g Kg^{-1}) tornam as suas sementes como um importante valor nutricional, considerando que as sementes secas contém 18 – 25 % de proteínas. Os principais ácidos graxos saturados presentes na sementes são ácidos palmítico, esteárico, araquídico e bénico (ABDULKARIM *et al.*, 2005 *apud* FERREIRA *et al.*, 2008). O ácido oleico é o principal ácido graxo insaturado (67,9 – 70,0%).

O açúcar e o amido contidos na planta *Moringa oleifera* (estão concentrados na folha com valores de 10 e 8 %, respectivamente) tem o uso potencial para a produção de álcool industrial. Além disso, a *Moringa oleifera* tem grande importância na produção de biodiesel por ser uma das espécies vegetais com um maior conteúdo em óleo (média de 35%) (FOIDL & MAYORGA, 2000 *apud* PEREIRA, 2015).

2.6. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS)

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica analítica utilizada com muito êxito na determinação de metais e semi-metais, sendo possível determinar amostras líquidas, sólidas, em suspensão, gasosas e a possibilidade de associação a sistema de análise por injeção em fluxo, dependendo do atomizador empregado (chama, forno de grafite, filamento de tungstênio, celas de quartzo, dentre outros) (WELZ; SPERLING, 1999 *apud* COSTA, 2018). Análise de soluções aquosas são as mais comuns na maioria dos estudos espectroscópicos e amostras sólidas refratárias (e difíceis de dissolver) são menos comuns devido a baixa reprodutibilidade (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2008).

A espectrometria de absorção atômica baseia-se na absorção da radiação eletromagnética nas regiões visível ou ultravioleta do espectro eletromagnético por átomos gasosos livres no estado fundamental (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). O sinal de absorbância gerado é referente ao logaritmo da razão da intensidade da radiação incidida (I_0) sobre a intensidade de radiação transmitida (I_t), sendo que este sinal de absorbância se relaciona

com a concentração de acordo com os princípios da Lei de Lambert-Beer, de acordo com a equação 1.

$$A = \frac{I_0}{I_t} = a b C$$

Equação 1

Onde:

A = absorbância

I_0 = intensidade da radiação incidente

I_t = intensidade da radiação transmitida

a = coeficiente de absortividade molar do meio

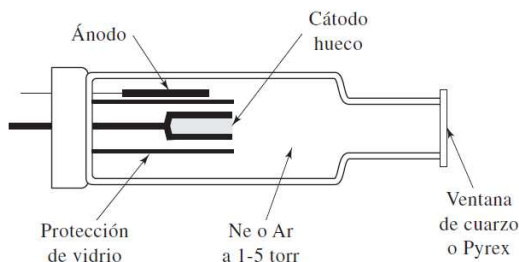
b = volume de observação

C = concentração mol L⁻¹

Os principais componentes utilizados na espectroscopia de absorção atômica (AAS) são: fonte de radiação, atomizador, conjunto monocromador e detector. As fontes de radiação são lâmpadas que geram o espectro de emissão do elemento de interesse, sendo que os tipos mais comuns são: lâmpada de cátodo oco (HCL – Hollow Cathode Lamp), lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL – Electrodeless Discharge Lamp) e lâmpada de arco de Xenônio. As linhas de emissão utilizadas em AAS para o Cu são nos comprimentos de onda λ em nm: 342,8; 327,4; 217,9; 218,2; 222,6; 244,2 nm, para o Ni são: 232,0; 352,5; 351,5; 362,5 nm, para o Ca: 422,7 nm, para o Fe: 248,3 nm, entre outros elementos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Como pode ser observado na Figura 2, a lâmpada de cátodo oco é composta por um cátodo cilíndrico confinado com gás neônio, a uma pressão de 1 a 5 torr, dentro de um tubo de vidro fechado e um ânodo de tungstênio sob um invólucro de Pyrex (SKOOG; HOLLER; CROUCH, p. 238, 2008).

Figura 2: Corte transversal de uma lâmpada de cátodo oco (FONTE: SKOOG; HOLLER; CROUCH, p. 238, 2008).



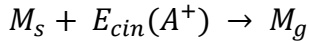
O cátodo é construído de uma camada do metal cujo espectro se deseja obter. Uma corrente elétrica é gerada pela diferença de potencial, na ordem de 300 V, aplicada nos eletrodos promovendo a ionização do gás neônio. Assim os cátions do gás gerados, em contato com a parede do cátodo, dissolvem alguns dos átomos metálicos da superfície do cátodo formando uma nuvem atômica em um processo chamado ablação (“sputtering”). Uma parte dos átomos desprendidos estão no estados excitados e portanto emitem sua radiação característica quando retornam ao estado fundamental. Os átomos metálicos se difundem novamente e são redepositados na parede do cátodo ou nas paredes do vidro. A superfície cilíndrica do cátodo tende a concentrar a radiação em uma região limitada do tubo metálico e aumenta a probabilidade da redeposição do metal no cátodo e não nas paredes do vidro. A eficiência das lâmpadas de cátodo oco depende da sua forma e da voltagem de operação. Voltagens mais altas, promovem maiores correntes e portanto intensidades maiores. Esta vantagem é um pouco compensada por um aumento na propagação Doppler das linhas de emissão da lâmpada. No entanto voltagens muito elevadas, geram uma maior quantidade de metais gasosos no estado não excitados, o que ocorre um efeito de autoabsorção da energia, refletindo em uma intensidade resultante menor (geralmente no meio do pico) (SKOOG; HOLLER; CROUCH, p. 238, 2008). O princípio de operação da lâmpada de cátodo oco pode ilustrado por meio das equações 2 – 5.

Ionização:



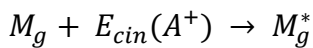
Equação 2

Ablação (“sputtering”):



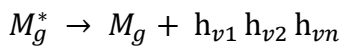
Equação 3

Excitação:



Equação 4

Emissão:



Equação 5

O monocromador tem a função de separar a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, através da utilização de um prisma ou rede de difração associado a duas fendas estreitas que servem para entrada e saída da radiação (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Os detectores transformam a energia de um fóton de luz em energia elétrica (“Efeito fotoelétrico”). A maior parte dos instrumentos de absorção atômica usam tubos fotomultiplicadores como detector (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Os atomizadores de chama são usados para espectroscopia de absorção atômica, de fluorescência e de emissão. É no atomizador que os íons são convertidos em átomos gasosos no estado fundamental (na forma livre ou associados). Os tipos mais conhecidos são: com chama (F AAS), com atomização eletrotérmica (ET AAS), com geração de hidretos (HG AAS), com geração de vapor atômico a frio (CV AAS). Os tipos de chama utilizados em F AAS são de C₂H₂/ar atmosférico, com temperaturas de ~ 2300°C e C₂H₂/N₂O a ~ 2900°C (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A precisão e a exatidão dos métodos atômicos dependem dos processos de atomização e do método de introdução da amostra na região da atomização (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2008), além de outros fatores (interferentes). As interferências em AAS são

consideradas quando qualquer fator impedir a formação do analito de interesse em átomo gasoso no estado fundamental, estando diferente das soluções de calibração utilizadas nas determinações. As interferências comprometem a precisão e exatidão dos resultados, devendo ser eliminadas ou corrigidas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As interferências em AAS podem ser não espectral e espectral. A interferência não espectral pode ocorrer quando a solução da amostra possuir composição muito diferente das soluções de calibração, afetando a taxa de aspiração do nebulizador (chamada de interferência de transporte), quando coexistir em uma amostra o analito e uma alta concentração de elemento concomitante, ambos facilmente ionizáveis (interferência de ionização) e a possibilidade de ocorrer reações químicas, indesejadas, entre o analito e os concomitantes, como reações secundárias entre átomos, radicais ou moléculas, formação de compostos refratários (Ex.: CaSO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), formação de haletos refratários (Ex.: AlF_3) e formação de óxidos complexos (Ex.: MgAl_2O_4 (s), CaTiO_3 (s), CaSiO_3 (s)), na fase líquida ou na fase vapor (interferência química). As principais interferências espectrais são: sobreposição de linhas entre o analito e outro elemento, separação incompleta da radiação absorvida pelo analito de outras radiações, espelhamento de radiação causada por partículas sólidas e absorção de radiação no λ do analito por moléculas dos concomitantes. As interferências espectrais são mais frequentes em forno de grafite. Para minimizar as interferências não espectrais, como a de transporte, soluções de calibração e amostra podem ser preparadas em um mesmo meio, além da possibilidade de realização da calibração com curvas analíticas em meio da amostra (requisitos: a amostra deve ter composição constante, além da amostra utilizada para construção da curva de calibração dever conter baixa concentração do analito de interesse). A interferência de ionização pode ser minimizada por meio da adição de um supressor de ionização (tampão de ionização, ex.: KCl e CsCl) com baixo potencial de ionização. Para minimizar a interferência de reação química em chama pode-se aumentar a temperatura (chama $\text{N}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_2$), usar chama redutora e/ou combinar o elemento interferente com outro elemento (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um procedimento analítico de extração e pré-concentração de íons Cu(II) por DPX em água para hemodiálise e detecção por F AAS, utilizando dispositivos de ponteiros de micropipetas e o pó da polpa de sementes de *Moringa oleifera* Lamarek como adsorvente.

3.2. Objetivos Específicos

- Adaptar o dispositivo de extração e pré-concentração em ponteiros descartáveis DPX com montagem simples e baixo custo;
- Preparar o material adsorvente, otimizar as variáveis envolvidas nos processos adsorptivos e etapas da técnica DPX em busca de aumento de sensibilidade e aplicabilidade analítica;
- Determinar alguns parâmetros de desempenho tais como: faixa linear, fator de enriquecimento, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e seletividade.
- Aplicar o procedimento validado em amostras de água para hemodiálise.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentação

As análises foram realizadas utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (Varian Spectra AA-220, Victória Austrália), equipado com lâmpada de cátodo oco e lâmpada de deutério para correção de radiação de fundo. As condições de operação foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 5).

Tabela 5: Condições de operação utilizadas na detecção de cobre por F AAS.

Parâmetros de operação por F AAS	Valores
comprimento de onda (λ)	324,8 nm
corrente da lâmpada	5 mA
altura do queimador	17 mm
largura da fenda espectral	0,1 nm
vazão de acetileno	2 L min ⁻¹
vazão de ar	13,5 L min ⁻¹

O pH das soluções e amostras foi ajustado usando um pHmetro modelo AKSO (pH Pro LineLab, São Paulo, Brasil).

O espectro na região do infravermelho médio foi obtido utilizando um Espectrômetro com Transformada de Fourier (IR Prestige-21, Shimadzu, Tóquio, Japão).

As imagens morfológicas das sementes de *Moringa oleifera* foram obtidas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (VEGA 3, TESCAN) com magnificações na ordem de 100, 1000 e 5000 vezes.

A composição elementar superficial das sementes de *Moringa oleifera* e mapeamentos de distribuição foram obtidos utilizando um detector EDS (INCA X-ACT standard, Oxford) acoplado ao MEV.

As análises de MEV-EDS da polpa da semente de *Moringa oleifera* foram realizadas no Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

As análises de FT-IR foram realizadas no laboratório do Grupo de Pesquisas em Materiais Inorgânicos (GMIT).

4.2. Reagentes, soluções padrão e amostra

As soluções de trabalho foram preparadas com água deionizada obtida do sistema de purificação de água ($>18\text{ M}\Omega\text{ cm}$, Gehaka - São Paulo, Brasil) e utilizados reagentes de grau analítico. As soluções de Cu(II) foram preparadas a partir de solução padrão para absorção atômica (1000 mg L^{-1} , SPECSOL). Ácido clorídrico (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e hidróxido de sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil) foram utilizados em todos os experimentos com ajuste de pH e no estudo do eluente. Utilizou-se também o ácido nítrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) no estudo do eluente.

A amostra de água para hemodiálise foi coletada no setor de hemodiálise no Hospital de Clínicas de Uberlândia (UCU/UFU), no local onde a água após tratamento fica armazenada. A amostra foi coletada em frascos de polietileno de alta densidade (PEAD) limpos e armazenada em geladeira até a análise.

Antes do uso, as vidrarias, os materiais e frascos foram lavados com detergente neutro, permanecendo imersos em solução aquosa de ácido nítrico a 10 % (v/v), durante 12 h e posteriormente enxaguados com porções de água deionizada.

4.3. Preparação do adsorvente natural

As sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram obtidas comercialmente na ArboCenter (São Paulo, Brasil). As sementes foram separadas das cascas e então, as polpas foram trituradas em liquidificador (Black & Decker, São Paulo, Brasil), secas à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e peneiradas em tamanhos de 500, 250, $180\text{ }\mu\text{m}$. O pó do material após secagem foi armazenado hermeticamente em frasco de polietileno e mantido em dessecador, à temperatura ambiente. Nenhum pré-tratamento químico foi realizado no material adsorvente de pó da polpa das sementes de *M. oleifera* Lam.

4.4. Preparo do sistema DPX

Os estudos iniciais foram realizados com as ponteiras DPX comerciais de 5 mL, lã de vidro (Êxodo - Metaquímica, Santa Catarina, Brasil), como filtro inferior (20 mg) e seringa para aspiração e ejeção da amostra (10 mL), como apresentado na Figura 3 A. As Figuras 3 B apresentam o dispositivo DPX adaptado usando uma ponteira de micropipeta de 5 mL (tipo Gilson), um conector de tubo de polietileno cilíndrico com diâmetro compatível, lã de vidro,

como filtro inferior (40 mg) e uma seringa para aspiração e ejeção da amostra (20 mL). A Figura 3 C apresenta o adsorvente de pó de polpa de sementes de *Moringa oleifera* Lam. e a lã de vidro, que são inseridos manualmente dentro das ponteiras.

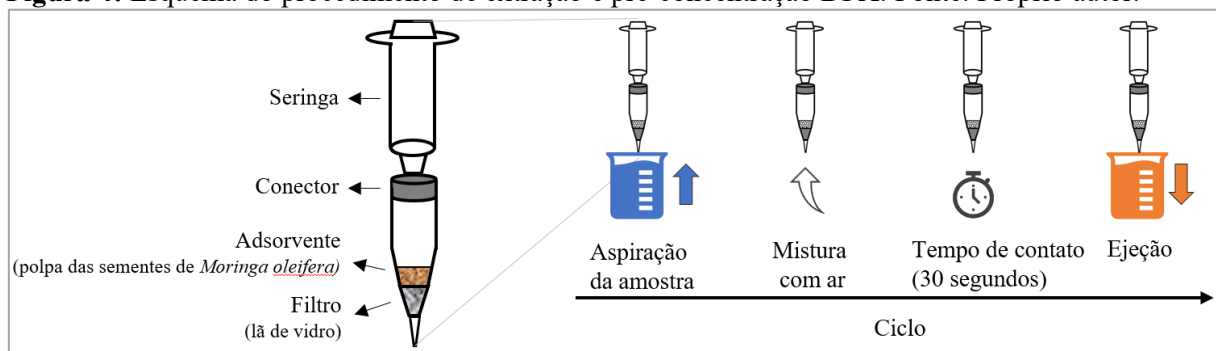
Figura 3: (A) Dispositivo DPX comercial 5 mL; (B) Dispositivo DPX adaptado: conector de tubo de polietileno, ponteira de micropipeta tipo Gilson de 5 mL e seringa 20 mL; (C) Adsorvente de pó de polpa de sementes de *Moringa oleifera* Lam. e lã de vidro. Fonte: Próprio autor.



4.5. Procedimento DPX e otimização da pré-concentração de Cu(II)

O procedimento de extração e pré-concentração DPX foi realizado de acordo com as seguintes etapas: condicionamento, extração e eluição. A Figura 4 ilustra o dispositivo de ponteiros DPX e a dinâmica do ciclo (s), que são realizados em cada etapa DPX. Um ciclo corresponde a aspiração de todo volume de amostra, seguido da aspiração de 5 mL de ar (mistura ar, adsorvente e amostra/analito), espera de 30 s de contato e posterior ejeção da amostra (Figura 4). Quando a amostra é ejetada ela pode ser reutilizada para o próximo ciclo ou ela pode ser descartada ou armazenada para análise. A quantidade de ciclos para extração e eluição são otimizadas.

Figura 4: Esquema do procedimento de extração e pré-concentração DPX. Fonte: Próprio autor.



As variáveis que afetam o procedimento DPX foram otimizadas de forma univariada. O pH da solução, o tamanho da partícula e a massa do adsorvente foram variados na faixa de 1-8; 500-180 μm e 10-50 mg, respectivamente. A etapa do condicionamento do adsorvente foi estudada aspirando H_2O deionizada e posterior ejeção. O número de ciclos de extração e de eluição também foram avaliados. A avaliação dos ciclos para a etapa de extração foi realizada tanto com a aspiração da mesma alíquota para o próximo ciclo, quanto com a aspiração de uma nova alíquota. A eluição foi estudada de acordo com o tipo de eluente (ácido clorídrico, ácido nítrico e hidróxido de sódio), a sua concentração (0,05 – 1 mol L^{-1}), o volume (200 – 350 μL) e o ciclos de eluição (até 2 ciclos). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas ($n = 3$) e brancos analíticos foram preparados da mesma maneira simultaneamente.

4.6. Ponto de Carga Zero (pH_{PCZ})

O pH de PCZ foi realizado adicionando 50 mg de pó da polpa da semente de *Moringa oleifera* em contato de 50 mL de água deionizada com o pH ajustado (variação de 1-12) (ROBLES; REGALBUTO, 2004). O pH foi ajustado com soluções de NaOH (0,05 - 2,0 mol L⁻¹) e HCl (0,05 - 0,5 mol L⁻¹). A mistura (adsorvente e solução aquosa) ficou sob agitação a 180 rpm por 1 h, em mesa agitadora orbital (Tecnal TE-141). Após 24h, a mistura foi filtrada, descartando o adsorvente residual e determinando o pH do sobrenadante.

Os resultados foram apresentados em dois gráficos: (1) pH final VS pH inicial e (2) subtração entre pH inicial e pH final VS pH inicial. No primeiro gráfico, o pH_{PCZ} é a faixa de pH final constante, obtido pela média dos valores de pH que se encontram constantes. No segundo, o pH_{PCZ} é o pH que o eixo y (subtração entre pH inicial e pH final) é próximo de zero.

4.7. Validação do procedimento analítico

O procedimento analítico proposto foi avaliado a partir das curvas de calibração sem pré-concentração (PC) e com PC e obtenção das figuras de mérito. As curvas foram construídas a partir de padrões de Cu(II) em meio aquoso na faixa de 75-1000 µg L⁻¹ (sem PC) e 10-100 µg L⁻¹ (com PC). A curva com PC foi construída passando as soluções padrão de Cu(II), os brancos e as amostras pelo procedimento DPX nas condições otimizadas, em triplicatas. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados como 3 e 10 vezes os desvios padrões dos brancos dividido pela inclinação das curvas de PC, respectivamente. A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada por meio do coeficiente de correlação linear (r), teste de Mandel e análise de resíduos. O fator de enriquecimento foi obtido pela razão das inclinações das curvas com e sem PC. A exatidão foi avaliada por meio do teste de recuperação em água para hemodiálise em duas concentrações de Cu(II) (30,0 e 80,0 µg L⁻¹, n = 6) dentro da faixa de trabalho e a precisão pelo desvio padrão relativo (RSD) a nível de repetibilidade (80,0 µg L⁻¹, n = 9).

4.7.1. Limite de detecção

O LD é a menor concentração de analito detectável e distinguível do branco pelo método com um nível de confiança aceitável (IUPAC, 2002; ANVISA, 2005). O LD foi calculado com base nas medidas do branco usando a recomendação da IUPAC como $3\sigma/S$ (n = 10),

respectivamente, onde σ é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva de calibração com PC (IUPAC, 2002).

4.7.2. Limite de quantificação

O LQ é a concentração mais baixa de analito quantificada pelo método com precisão e exatidão aceitáveis (IUPAC, 2002). É a menor concentração para qual o desempenho do método é aceitável. Também pode ser considerado como o ponto mais baixo da curva de calibração, desde que seja diferente do branco (ANVISA, 2004). O LQ foi calculado com base nas medidas do branco usando a recomendação da IUPAC como $10\sigma/S$ ($n = 10$), onde σ é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva de calibração com PC (IUPAC, 2002).

4.7.3. Curva de calibração e linearidade

Em determinações quantitativas, a calibração refere-se a resposta de um sistema de medida que está relacionada a uma concentração ou a uma quantidade de substância conhecida (RELACRE 13, 2000). Normalmente é utilizado o método dos mínimos quadrados para a regressão linear da curva de calibração representada por uma função polinomial do primeiro grau (uma reta), pois pressupõe-se que os erros de distribuição são normais e exista homogeneidade de variâncias ao longo da reta (RELACRE 13, 2000). Caso se utilize o método dos mínimos quadrados, o eixo vertical (eixo y) representa a resposta instrumental do equipamento e, o eixo horizontal, (eixo x) representa as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezíveis frente aos de y (RELACRE 13, 2000). A regressão linear ponderada é menos usual e é utilizada quando não existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta, sendo que as incertezas em y são dependentes de x (Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017).

A função polinomial do primeiro grau fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, sendo que a forma algébrica da equação da reta é dada pela equação 6:

$$y = a + bx$$

Equação 6

Onde:

a = ordenada na origem

b = declive da reta

y = sinal medido

x = concentração do analito na solução

4.7.4. Avaliação da linearidade: coeficiente de correlação, teste de Mandel, análise de resíduos

A linearidade é a capacidade de um procedimento analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito ($y = a + b x$) (ICH, 2006). A avaliação da linearidade pode ser realizada por verificação visual, análise do coeficiente linear (r), testes estatísticos (por meio do teste F, também conhecido com F-*Snedecor* na análise da variância (ANOVA) da regressão), análise de resíduos, entre outros (EURACHEM GUIDE, 2014; DOQ-CGCRE-008, 2016; Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017).

Os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (r) são aceitos para a avaliação da calibração analítica, sendo que o valor de r é o resultado da raiz quadrada do valor de R^2 . O valor do coeficiente de correlação (r), pode tomar valores entre -1 e +1 ($-1 \leq r \leq +1$), devendo ser superiores a 0,995 para as curvas de calibração analíticas (RELACRE 13, 2000). O coeficiente de correlação não deve ser usado como único parâmetro indicação do melhor ajuste da linearidade (IUPAC, 2002; DOQ-CGCRE-008, 2016).

É desejável que haja critérios para aceitação das curvas de calibração analítica em relação a linearidade e a estabilidade entre calibrações. Para realizar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados para calibrações analíticas recomenda-se usar como referência a norma ISO 8466-1 (RELACRE 13, 2000).

4.7.4.1. Teste de Mandel

A linearidade pode ser avaliada por meio de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1 (RELACRE 13, 2000; DOQ-CGCRE-008, 2016). Um modelo estatístico muito utilizado é o teste de Mandel (RELACRE 13, 2000). Este teste avalia qual função matemática é mais adequada para representar a calibração da curva analítica investigada. A função matemática pode ser linear, $y = a + bx$ ou uma outra função suscetível de ajuste, como por exemplo: a função de 2ª ordem, $y = a + bx + cx^2$.

Desse modo, o teste de Mandel compreende um conjunto de cálculos a partir de um conjunto de pares ordenados, tais como:

- (1) A função de calibração linear ($y = a + bx$) e o desvio padrão residual da função linear ($S_{\frac{Y}{X}}$), de acordo com a equação 7:

$$S_{\frac{Y}{X}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}, \hat{y} = a + bx.$$

Equação 7

Onde:

$S_{\frac{Y}{X}}$ = desvio-padrão residual da função linear

y_i = sinal analítico medido de cada padrão de calibração

$\hat{y} = a + bx$. Substitui a concentração de cada padrão na equação da reta, obtendo \hat{y} .

n = número de padrões de calibração

- (2) A função de calibração não linear (por ex: de 2ª ordem, $y = a + bx + cx^2$) e desvio-padrão residuais da função, de acordo com a equação 8:

$$S_{Y^2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}}, \hat{y} = a + bx + cx^2$$

Equação 8

Onde:

S_{Y^2} = desvio-padrão residual da função de 2ª ordem

y_i = sinal analítico medido de cada padrão de calibração

$\hat{y} = a + bx + cx^2$. Substitui a concentração de cada padrão na equação da reta, obtendo \hat{y} .

n = número de padrões de calibração

- (3) A diferença das variâncias de acordo com a equação 9:

$$DS^2 = (N-2) \times S_{\frac{Y}{X}}^2 - (N-3) \times S_{Y^2}^2$$

Equação 9

Onde:

DS^2 = diferença das variâncias

$S_{\frac{Y}{X}}$ = desvio-padrão residual da função linear

S_{Y^2} = desvio-padrão residual da função de 2ª ordem

N = número de padrões de calibração

(4) Calcula-se o valor teste (PG) de acordo com a equação 10:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{Y^2}^2}$$

Equação 10

Onde:

PG = valor do teste

DS^2 = diferença das variâncias

S_{Y^2} = desvio-padrão residual da função de 2ª ordem

Assim, compara-se o valor PG com o F-*Snedecor* tabelado (F tabelado para número de graus de liberdade: numerador = 1 e denominador = n-3)

Se $PG \leq F$ = a função de calibração é linear

Se $PG > F$ = a função de calibração é não linear, devendo portanto investigar a possibilidade de reduzir a faixa de trabalho ou recorrer à ISO 8466/2 (ou a outra função suscetível de ajuste) (RELACRE 13, 2000; Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017).

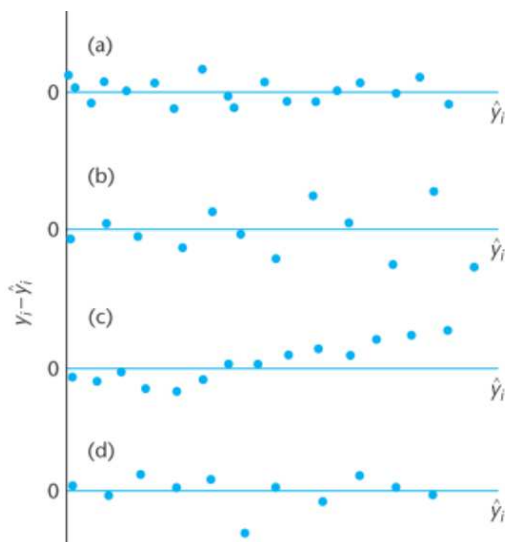
Algumas curvas analíticas não demonstram comportamento linear, mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, o comportamento pode ser descrito por uma outra função que modele a relação entre a concentração do analito e a resposta medida (DOQ-CGCRE-008, 2016).

4.7.4.2. Análise de resíduos

A distribuição dos resíduos da calibração pode ser usado para avaliar a eficiência da regressão linear utilizada (avaliação da linearidade), como também observar o comportamento das variâncias em uma curva de calibração com o aumento da concentração (GUARIEIRO *et al.*, 2008). Os resíduos são calculados pela diferença entre o sinal observado (y_i) e o valor de \hat{y}_i (calculado pela equação da reta de regressão, $\hat{y}_i = a + bx_i$, para cada valor de x_i) (GUARIEIRO *et al.*, 2008; DOQ-CGCRE-008, 2016; Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017). A partir de então, é plotado um gráfico do resíduo ($y_i - \hat{y}_i$) em função do \hat{y}_i , verificando

como os resíduos estão distribuídos ao longo do eixo x. A Figura 5 a-d apresenta alguns exemplos para interpretação dos resíduos.

Figura 5: Distribuição de resíduos (FONTE: Material disponibilizado no curso de Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade, oferecido à distância pela Universidade do Minho, Braga - PT, 2017).



Onde:

- (a) Distribuição aleatória em torno da linha reta, o que indica uma regressão linear satisfatória;
- (b) Aumento dos resíduos com o aumento do y (usar regressão linear ponderada);
- (c) Tendência na distribuição dos resíduos (usar outra função);
- (d) Distribuição satisfatória dos resíduos exceto para um valor suspeito.

Neste trabalho a linearidade das curvas de calibração sem PC e com PC foi avaliada por meio do coeficiente de correlação linear (r), teste de Mandel e análise de resíduos.

4.7.5. Fator de enriquecimento

O fator de enriquecimento (FE) é um parâmetro utilizado para avaliar a eficiência dos sistemas de pré-concentração (ALVES, 2013; CONRADO, 2019). O termo refere-se matematicamente como a razão entre a concentração do elemento de interesse após a concentração, C_c e a concentração original, C_o (ALVES, 2013). A equação 11 refere-se ao cálculo do FE.

$$FE = \frac{C_c}{C_o}$$

Equação 11

Onde:

FE = fator de enriquecimento

C_c = concentração do elemento de interesse após a concentração

C_o = concentração original

Alves (2013) complementa que na prática a concentração real do elemento de interesse na solução concentrada (C_c) é desconhecida, recorrendo portanto a uma aproximação do fator de enriquecimento estimada pelo aumento da resposta do detector. Desse modo, o FE é determinado por meio do cálculo da razão dos coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem a etapa de pré-concentração, de acordo com a equação 12:

$$FE = \frac{b_p}{b_s}$$

Equação 12

Onde:

FE = fator de enriquecimento

b_p = coeficiente angular da curva com pré-concentração

b_s = coeficiente angular da curva sem pré-concentração

4.7.6. Precisão

A precisão representa a dispersão entre um conjunto de valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas. É expressa numericamente por características como o desvio padrão, variância e o coeficiente de variação. O coeficiente de variação é também conhecido como desvio padrão relativo (R.S.D) (Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017).

Para avaliar a precisão é utilizado o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV) de acordo com a equação 13:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 13

Onde:

s = desvio padrão de um conjunto de medidas, x_i

\bar{x} = média de x_i

CV (%) = coeficiente de variação

A precisão pode ser avaliada em termos da repetibilidade, da precisão intermédia ou da reprodutibilidade. Essas condições especificadas diferem entre si de acordo com as diferentes condições de análise, tais como: intervalo de tempo, sistemas de medição (equipamentos), operadores, local, entre outros. Na repetibilidade deve-se manter sempre as mesmas condições, tais como: mesmo operador, mesmo procedimento de medição, mesmas condições de medição, medições repetidas no mesmo objeto (ou em objetos similares), mesmo local, em um curto intervalo de tempo (geralmente no mesmo dia). Logo para obter a precisão intermédia algumas condições devem ser mantidas e variando outras. Desse modo, na precisão intermédia deve ser mantido o mesmo procedimento de medição, as mesmas condições de medição, medições repetidas no mesmo objeto (ou em objetos similares) e o mesmo local, variando o espaço de tempo, que é mais longo do que na repetibilidade (3 dias consecutivos), além de outras condições, tais como: diferentes operadores, padrões e sistemas de medição, além de novas calibrações. Na reprodutibilidade, mantém o mesmo procedimento de medição e as mesmas condições repetidas no mesmo objeto (ou em objetos similares), variando todas as outras condições citadas. Como exemplo, para obter a reprodutibilidade, as análises devem ser realizadas em laboratórios diferentes, os quais apresentam características diferentes tais como: operadores com experiências diferentes, equipamentos com características diferentes, reagentes com datas de fabricação diferentes, etc. É esperado um aumento no desvio padrão com o aumento de condições diferentes dos sistemas de medição (EURACHEM GUIDE, 2014; DOQ-CGCRE-008, 2016; Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017).

Para obter a precisão a nível de repetibilidade pode ser utilizado materiais de referência certificado, da amostra ou do branco fortificado com concentrações dentro da gama de trabalho. Em geral, devem ser realizadas de 6 – 15 réplicas independentes (com o mesmo analista e mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo) e determinado o desvio padrão (EURACHEM GUIDE, 2014; DOQ-CGCRE-008, 2016). O número mínimo de réplicas varia de acordo com documento de validação (DOQ-CGCRE-008, 2016). Em geral um CV < 10 % é satisfatório (Material de Apoio Complementar: Validação UMinho, 2017). Os resultados de repetibilidade são calculados de acordo com a equação anterior, tais com: desvio padrão de repetibilidade (s_r) e coeficiente de variação de repetibilidade ($CV_r = 100 s_r / \bar{x}$). Uma forma de avaliar se os resultados de duas réplicas são aceitáveis em termos de repetibilidade é calculando

o limite de repetibilidade (r), por meio da multiplicação do desvio padrão obtido por 2,8 ($r = 2,8 s_r$). O valor do limite (r) encontrado compara-se com o resultado da diferença entre os valores de 2 réplicas em condições de repetibilidade $|x_i - x_{i-1}|$. Assim, aceitam-se os valores de 2 ensaios, em condições de repetibilidade, se $|x_i - x_{i-1}| \leq r$. Se caso a amplitude entre 2 ensaios for superior ao limite (r), deve-se fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição do ensaio (RELACRE 13, 2000; EURACHEM GUIDE, 2014).

A precisão foi avaliada a nível de repetibilidade por meio do desvio padrão relativo das amostras de hemodiálise fortificadas (Cu(II) $80 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 9$). Não foi realizado 10 ensaios devido a quantidade de amostras de água para hemodiálise disponíveis no período de estudo.

4.7.7. Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre um valor obtido de um ensaio e um valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (RELACRE 13, 2000).

O termo exatidão de uma série de resultados de um ensaio é constituído de uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos (RELACRE 13, 2000). Desse modo, uma medição é considerada mais exata quando fornece um erro de medição menor (MATERIAL DE APOIO COMPLEMENTAR: Validação UMinho, 2017).

Outra forma de expressar a exatidão é considerar que a mesma é constituída pelas componentes “veracidade” e “precisão” (MATERIAL DE APOIO COMPLEMENTAR: Validação UMinho, 2017). Veracidade é o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência (VIM, 2012), porém esta componente não pode ser medida. A veracidade é expressa quantitativamente como *bias* (ou *bias* relativo) que é definido como a estimativa do erro sistemático (EURACHEM GUIDE, 2014). Na prática, a veracidade é determinada como a diferença entre a média obtida a partir de um número elevado de medições repetidas e o valor de referência de uma amostra (MATERIAL DE APOIO COMPLEMENTAR: Validação UMinho, 2017).

São possíveis três tipos de abordagens gerais para avaliação da veracidade (*bias*): (a) Ensaios de recuperação em amostras; (b) Análise de materiais de referência ou (c) Comparação com os resultados obtidos com um método alternativo (EURACHEM GUIDE, 2014).

4.7.7.1. Ensaios de recuperação

A recuperação do analito é uma abordagem utilizada para avaliação da exatidão (expresso pelo *bias*) (EURACHEM GUIDE, 2014) e pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) (DOQ-CGCRE-008, 2016). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de trabalho do método (EURACHEM GUIDE, 2014). A recuperação ideal deve ser próxima de 100 %, no entanto, recuperações mais distantes de 100 % são aceitas dependendo da concentração do analito e da matriz da amostra. A taxa de recuperação é dependente da concentração do analito (DOQ-CGCRE-008, 2016). Desse modo, o *bias* pode variar dependendo da matriz e/ou nível de concentração (MATERIAL DE APOIO COMPLEMENTAR: Validação UMinho, 2017).

Portanto, para avaliação da recuperação pode-se usar brancos de amostras, amostras testes ou amostras fortificadas com o analito, em 10 determinações independentes (EURACHEM GUIDE, 2014). Compara-se a diferença entre a média do valor fortificado e a média do valor com a concentração da fortificação, de acordo com a equação 14 (DOQ-CGCRE-008, 2016):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Equação 14

Onde:

C1 = Concentração de analito determinado (valor médio) na amostra fortificada

C2 = Concentração de analito determinado (valor médio) na amostra não fortificada

C3 = Concentração do analito adicionado (valor conhecido) à amostra fortificada

O analito adicionado não está necessariamente na mesma forma do que a presente na amostra o que pode ser uma limitação. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (DOQ-CGCRE-008, 2016).

A exatidão neste trabalho foi avaliada por meio de resultados independentes de recuperação obtidos da fortificação da água para hemodiálise em dois níveis de concentrações de Cu(II) (30 µg L⁻¹ e 80 µg L⁻¹, n = 6). Não foi realizado três níveis de concentrações devido a quantidade de amostras de água para hemodiálise disponíveis no período de estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

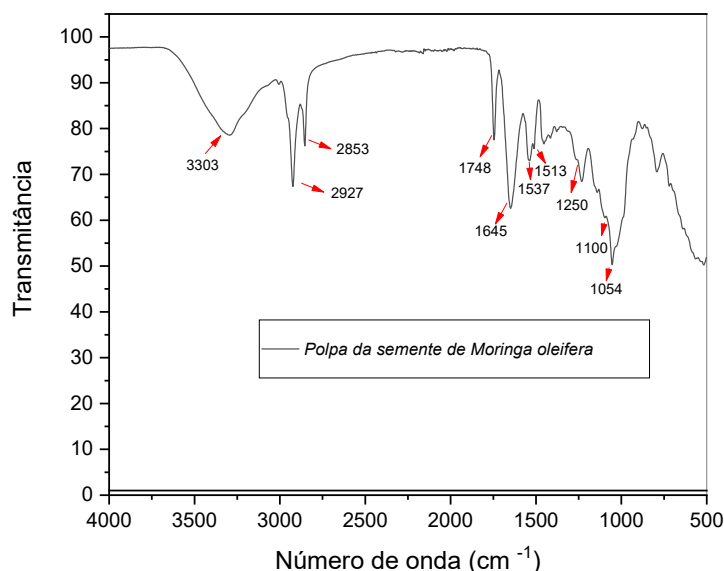
5.1. Caracterização das sementes de *Moringa oleifera*

As sementes de *Moringa oleifera* são bem estabelecidas como material adsorvente aplicado na remoção de íons metálicos em meio aquoso. Ensaios de caracterização estrutural tais como espectroscopia por infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pH_{PCZ} remetem a sua adequação para finalidades de extração e pré-concentração por DPX.

5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho Médio por transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho (FT-IR) foi utilizada para elucidar os principais os grupos funcionais presentes nas sementes de *Moringa oleifera* que possam estar envolvidos em processos de adsorção. A Figura 6 apresenta o espectro de infravermelho médio do pó polpa da semente de *M. oleifera* Lam. “*in natura*”.

Figura 6: Espectro de Infravermelho Médio da polpa da semente de *Moringa oleifera* “*in natura*”.



O espectro de infravermelho apresentou uma banda larga centrada na região de 3303 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação O-H de álcoois e fenóis de estruturas de proteínas, ácidos graxos, carboidratos e unidades de lignina presentes nas sementes de *Moringa* (DO CARMO, 2014). Além disso, o aumento dessa banda pode estar relacionado aos estiramentos de ligação N-H de grupos amida devido ao elevado teor proteico. Os picos em 2927 cm⁻¹ e 2853

cm^{-1} são característicos de estiramentos vibracionais assimétrico e simétrico, respectivamente, de ligação C-H de CH_2 de grupos presentes nos ácidos graxos (ARAÚJO *et al.*, 2010).

A região entre 1800 e 1600 cm^{-1} está associada aos estiramentos de carbonilas ($\text{C}=\text{O}$). O pico de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ em 1748 cm^{-1} está associado a ésteres de ácidos graxos de lipídeos (ARAÚJO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013). Sinais de 1740 a 1720 cm^{-1} são de estiramentos de carbonilas de cetonas não conjugadas, de ésteres provenientes de carboidratos e grupos carboxílicos (LIMA *et al.*, 1996 *apud* ALVES, 2013). O pico de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ em 1645 cm^{-1} é característico de amida de proteínas (ARAÚJO *et al.*, 2010).

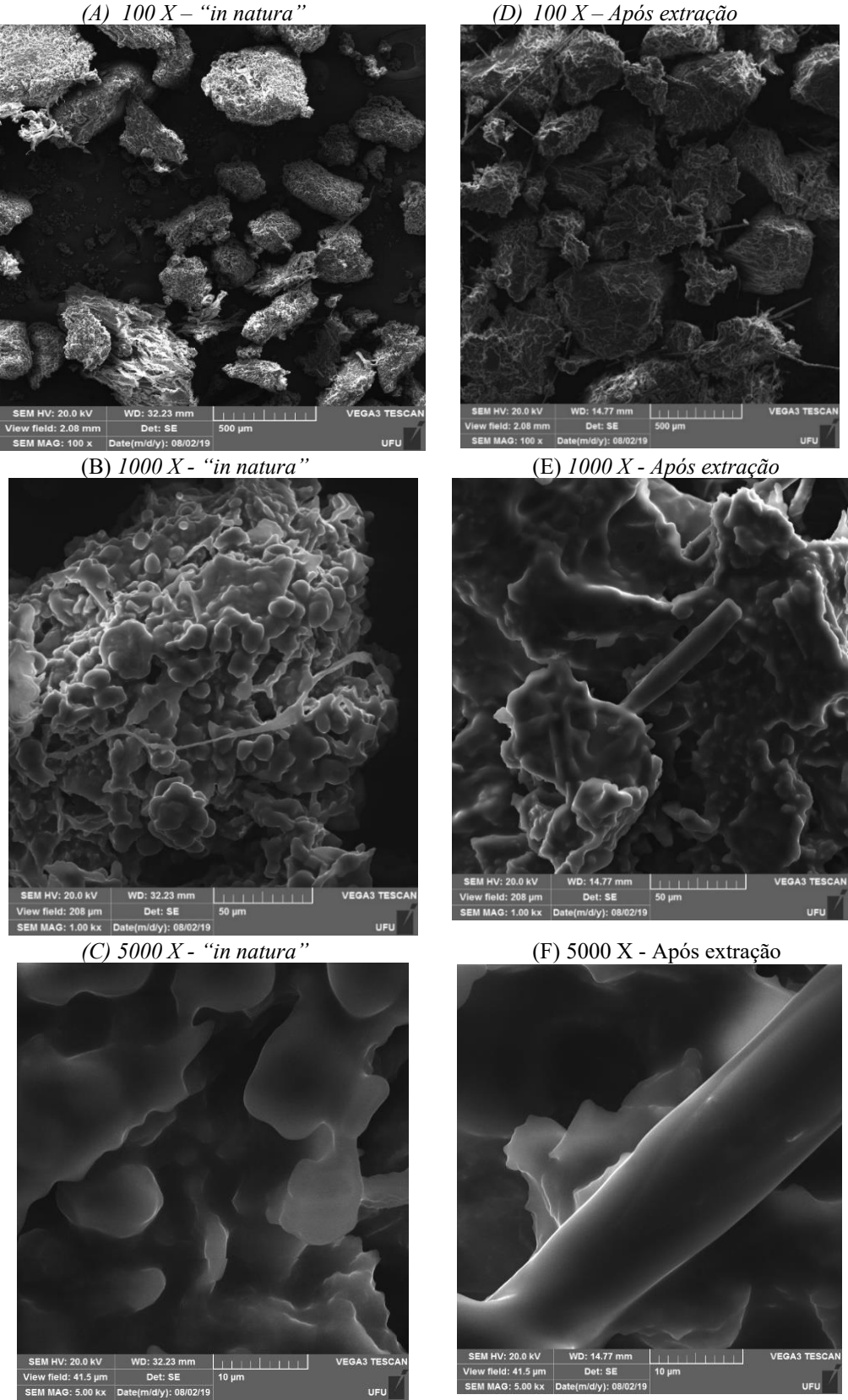
O pico em 1537 cm^{-1} pode ser associado ao estiramento C-H e/ou deformação N-H. Uma banda na de região de 1513 cm^{-1} é característica de esqueleto aromático (ALVES, 2013). As bandas em 1110 cm^{-1} e 1054 cm^{-1} estão relacionadas à vibração ν (C-O) de álcool primário e secundário, respectivamente. A banda em 1250 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de ésteres e epóxidos (HJERSEN *et al.*, 2001 *apud* ALVES, 2013). A função éster pode ser confirmada por uma banda forte na região de 1250 a 1000 cm^{-1} (COSTA *et al.*, 2013).

Como as sementes de *M. Oleifera* possuem significativa porção proteica, a presença de grupos funcionais tais como a carbonila associada a ligações peptídicas, bem como ésteres de ácidos graxos, carboxilatos, aminas e hidroxilas podem facilitar a interação com os íons metálicos, dependendo do meio que se encontra.

5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O perfil morfológico da polpa das sementes de *Moringa oleifera* foi obtido pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) com imagens com diferentes ampliações (100 a 5000 X). Essa análise foi realizada para o material em branco e após a extração com Cu(II) por DPX. Os resultados são apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da polpa de semente de *Moringa oleifera* com ampliações de 100-5000 X para o material em branco “*in natura*” (A - C) e após extração (D - F).



As imagens do MEV da Figura 7 A-C mostram uma superfície irregular e rugosa, permitindo espaços não preenchidos. Dessa forma, o material possui uma matriz heterogênea relativamente porosa. As sementes de *M. oleifera* apresenta uma composição diversificada como celulose, hemicelulose e lignina o que justifica esse perfil característico (DO CARMO, 2014). A presença de deformações e espaços disponíveis na superfície do material são condições que favorecem a adsorção de espécies metálicas nos interstícios (ARAÚJO, 2010).

As imagens do MEV após extração com Cu(II) apresentam uma leve modificação na superfície no material relacionados com a adsorção do metal e da água, além de resíduos de lã de vidro (Figura 7 D-E).

Acoplado ao MEV a espectroscopia por energia dispersiva (EDS-energy-dispersive spectroscopy) permitiu a identificação e determinação da porcentagem em massa dos elementos químicos presentes nas sementes de *Moringa oleifera*. A análise foi realizada com o material “*in natura*” e após a extração com íons Cu(II) por DPX. Os resultados são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados de EDS (% em massa) da polpa da semente de *Moringa oleifera* (PSMO) “*in natura*” e adsorvido obtidos pelo EDS com o aumento de 100 e 1000 vezes.

PSMO	Magnificação	% em massa										
		C	O	Mg	P	S	K	Ca	Cl	Al	Na	Si
“ <i>In Natura</i> ”	100	74,62	24,33	0,08	0,21	0,44	0,25	0,05	0,02	0,01	-	-
“ <i>In Natura</i> ”	1000	78,95	20,00	0,11	0,27	0,42	0,37	0,04	-	-	-	-
Adsorvido	100	71,14	27,21	0,12	0,23	0,45	0,11	0,12	-	0,02	0,21	0,39
Adsorvido	1000	87,12	13,59	0,17	0,41	0,54	0,12	0,05	-	-	-	0,05

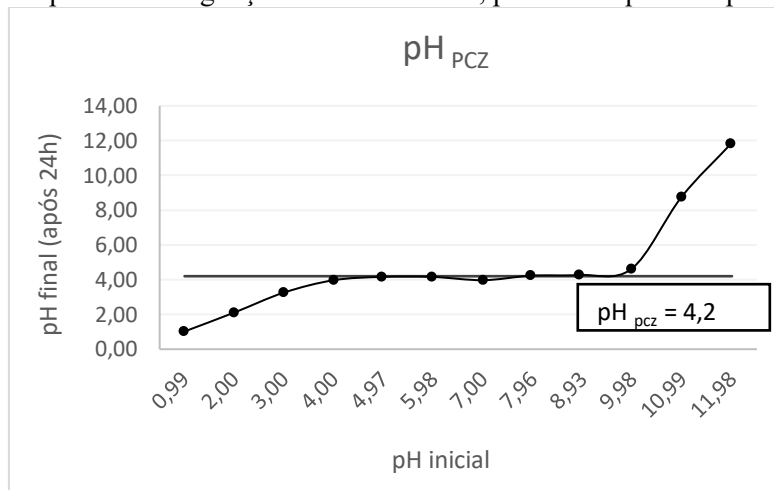
Os resultados de EDS mostram que o sorvente natural possui uma composição elementar diversificada, composta majoritariamente por C (74,62% em massa) e O (24,33% em massa) (Tabela 6). Os elementos como C, O e K são indicativos da presença do constituinte proteico no material (ALVES, 2013). Não foi possível observar o cobre na superfície do material.

5.1.3. pH_{PCZ}

O estudo do ponto de carga zero (pH_{PCZ}) foi realizado a fim de determinar em qual pH a carga líquida do adsorvente se anula (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014). O valor pH_{PCZ} encontrado foi de 4,2 e foi obtido verificando quando o pH final se encontrava constante (Figura

8). O significado do pH_{PCZ} é que em pH 4,2 as moléculas superficiais do material apresentam as cargas elétricas neutras, abaixo do pH_{PCZ} o material possui cargas superficiais positivas e acima do pH_{PCZ} cargas superficiais negativas. Isso quer dizer que os processos de adsorção de cátions são favorecidos na presença de moléculas carregadas negativamente em pH acima de 4,2.

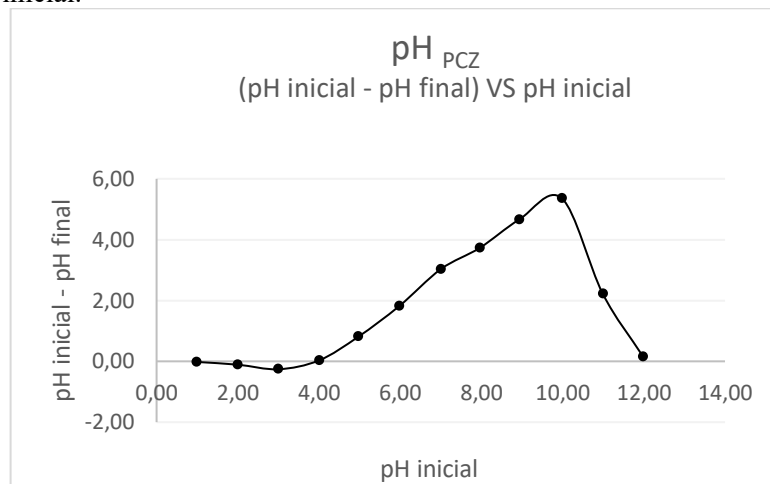
Figura 8: Estudo do pH_{PCZ} com 50 mg de polpa da semente de *Moringa oleifera* em 50 mL de água deionizada com ajuste de pH 1 a 12. Agitação em mesa orbital, por 1 h e equilíbrio por 24h.



A maioria dos aminoácidos presentes nas sementes de *Moringa oleifera* tem ponto isoelétrico na faixa de 4,0 – 8,0 (DELVIN, 2002 *apud* KUMARI *et al.*, 2006). Na faixa do ponto isoelétrico mais de 90% dos aminoácidos presentes contém sítios catiônicos (KUMARI *et al.*, 2006).

Outra forma que foi determinado o pH_{PCZ} foi pela diferença entre pH inicial e pH final em função do pH inicial. Essa diferença ($\text{pH}_{\text{inicial}} - \text{pH}_{\text{final}}$) deve ser próxima de zero, tal como observado no ponto (4,00, 0,03) da Figura 9. Pode-se observar um aumento dessa diferença entre pH final e inicial a partir do pH 5 inicial, porque o pH inicial foi aumentando enquanto o pH final permaneceu constante. A partir de pH inicial 11 essa diferença entre pH final e inicial diminui porque o pH final deixa de ficar constante.

Figura 9: pH_{PCZ} por meio gráfico, obtido pela diferença entre pH inicial e final (após 24h equilíbrio) em função do pH inicial.



As sementes de *Moringa oleifera* são constituídas principalmente de proteína (40%) e lipídeos (19%), sendo que o restante é composto por açúcares solúveis, oligossacarídeos e amido com teores menores ou igual a 6 % (GALAO; DAMASCENO; BRITO, 2006).

As proteínas são formadas geralmente por uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (fórmula geral $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$) formando moléculas com uma longa cadeia de resíduos de aminoácidos (MORTON; HEARLE, 2008 *apud* GIACOMINI *et al.*, 2017).

No caso das sementes de *Moringa oleifera*, em solução aquosa o biossorvente é composto por uma mistura heterogênea complexa contendo polipeptídeos com vários grupos funcionais e com uma variedade de estruturas que podem ficar carregados positivamente ou negativamente conforme o pH do meio, podendo atrair íons metálicos catiônicos ou aniônicos (COSTA *et al.*, 1997 *apud* KUMARI *et al.*, 2006).

A presença de grupos que se comportam como ácido e como base, dependendo da reação do qual eles participam, dão um caráter anfótero na superfície do material, como por exemplo, os aminoácidos possuem grupos carboxila (-COOH) que são ácidos e grupos amino (-NH_2) que são básicos (BURKINSHAW, 2016 *apud* GIACOMINI *et al.*, 2017). Quando o pH do meio estiver abaixo do pH_{PCZ} (ou pH_{IEC}) o grupo carboxílico dos aminoácidos são desprotonados como ligantes carboxilato (-COO^-) e simultaneamente protonando o grupo amino (-NH_3^+) (KUMARI *et al.*, 2006).

Dessa forma, o ponto de carga zero segue os mesmos princípios das reações iônicas ácido-base. No entanto, essa teoria assume que os prótons H^+ e os grupamentos hidroxílicos OH^- constituem íons determinantes em potencial, onde o adsorvente em solução aquosa pode

adsorver íons OH^- ou H^+ , dissociando-se ou associando-se a prótons da solução de acordo com o pH que o meio se encontra (CEROVIC et al., 2007 *apud* NASCIMENTO et al., 2014).

Além da adsorção física (forças eletrostática entre partículas carregadas (íons), entre outros tipos de interações), os processos de adsorção também podem ocorrer por meio de adsorção química (transferência ou compartilhamento de elétrons). Os processos de adsorção de íons Cu(II) pelas sementes são estudados à partir da construção de isotermas de adsorção, não contemplados neste trabalho.

Os resultados de caracterização realizados foram importantes para verificação se o material adsorvente apresenta composição e morfologia adequados que facilitem os processos adsorptivos envolvidos na extração e pré-concentração por DPX.

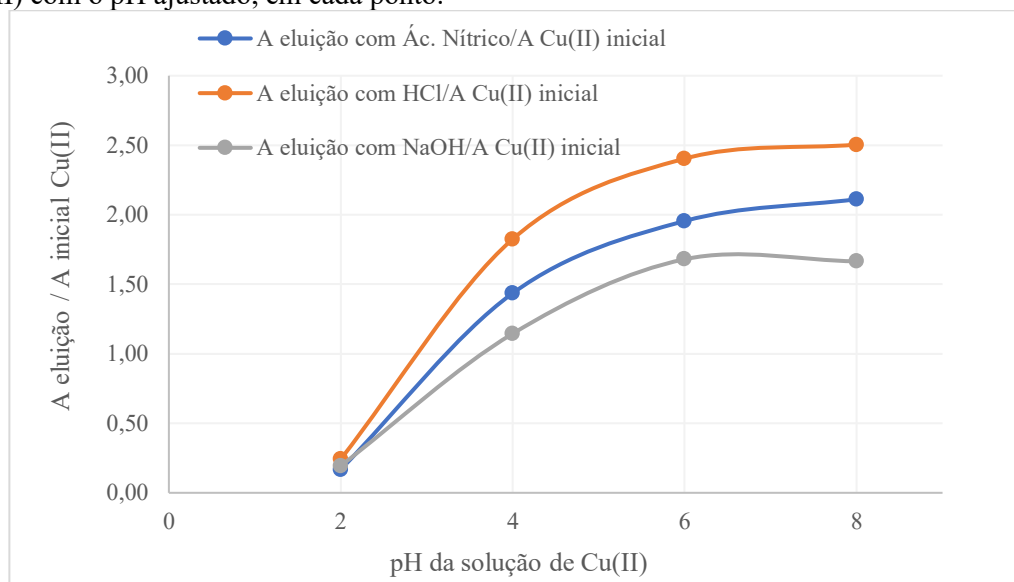
5.2. Otimização do procedimento DPX

5.2.1. Estudos do pH e do eluente

O pH do meio é um fator de grande importância em processos que envolvem adsorção de íons metálicos. O pH da solução de Cu(II) foi avaliado em função do sinal de eluição usando HNO_3 , HCl e NaOH como eluentes, a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ cada, em experimentos independentes, com intuito de avaliar a pré-concentração. Dessa forma foram preparadas soluções de Cu(II) variando o pH de 2 – 8 e submetidas pelo procedimento DPX, obtendo para cada solução de Cu(II) com pH ajustado, três sinais de eluição referente a cada eluente.

A Figura 10, representa no eixo y a razão da absorbância final de eluição sobre a absorbância inicial em cada valor de pH e eluente. Os resultados indicam que a adsorção de íons cobre foi favorecida com valores de pH da solução de íons Cu(II) mais próximos da neutralidade, sendo assim, concordantes com o pH_{PCZ} obtido e com dados da literatura. Os valores de pH 6,0 e 8,0 foram os sinais analíticos de pré-concentração mais promissores. O pH 6 foi escolhido por estar mais próximo do pH da água. O sinal analítico de pré-concentração indica que a adsorção pode ter sido favorecida pela carga líquida superficial das sementes de *Moringa* ser negativa ($\text{pH} > \text{PCZ}$), por meio de interações eletrostáticas com o cobre que se manifesta predominantemente com cargas positivas $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ e $[\text{CuOH}(\text{H}_2\text{O})_5]^+$.

Figura 10: Estudo do pH: Razão da absorbância final de eluição sobre a absorbância inicial do padrão de Cu(II) com o pH ajustado, em cada ponto.



Em relação ao melhor eluente o ácido clorídrico e o nítrico tiveram melhores resultados do que o hidróxido de sódio (Figura 10). O ácido clorídrico foi o eluente com melhor desempenho e pode ser explicado pelo efeito favorável de complexação dos íons cloreto com o cobre (II). Dessa forma o cobre é eluído na espécie $[\text{CuCl}_6]^{4-}$ como consequência da repulsão com as cargas negativas da superfície do adsorvente que vão simultaneamente sendo protonadas pelo equilíbrio ácido-base dos sítios ativos. O resultado menos favorável do NaOH pode estar relacionado com uma possível precipitação dos íons Cu^{2+} e OH^- na forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ em pH acima de 6.

O pH determina o grau de distribuição das espécies químicas e a carga da superfície do adsorvente, governando as interações eletrostáticas ente o adsorvente e o adsorvato (TOLEDO *et al.*, 2005 *apud* DO NASCIMENTO *et al.*, 2014). A intensidade desse efeito pode ser maior ou menor conforme o adsorvente, pois dependem da composição e das características da superfície do adsorvente (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Outros estudos da literatura com sementes de *Moringa oleifera* apresentam resultados semelhantes ao deste, como no estudo de bio sorção de Cd(II) que em pH 6,5 houve a maior sorção de íons Cd(II) (SHARMA *et al.*, 2006). No estudo de caracterização das sementes de *Moringa oleifera*, realizado por Araújo e colaboradores (2010), em pH 6,5 houve melhor adsorção de íons Ag(I), Cd(II), Co(II), Cu(II) and Pb(II).

Diante dos resultados, pH 6 para a solução de Cu(II) na etapa de extração e HCl 0,5 mol L^{-1} , como eluente, foram fixados nos próximos experimentos.

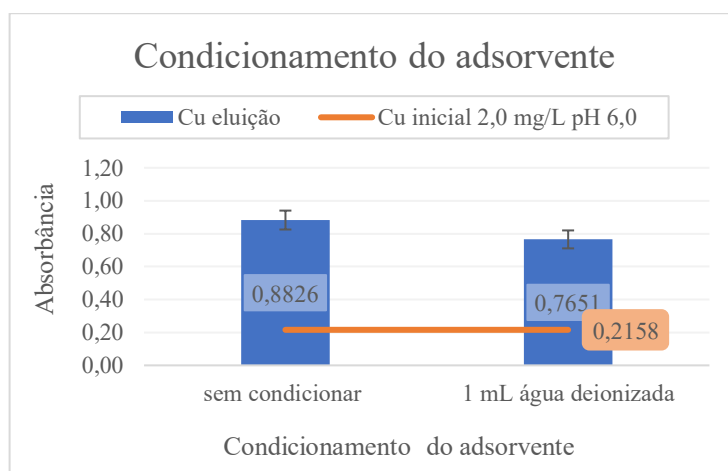
5.2.2. Condicionamento do adsorvente natural

O condicionamento do adsorvente pode favorecer a ativação dos sítios de ligações do adsorvente e melhorar a extração. O condicionamento do pó da polpa de semente de *Moringa oleifera* foi estudado com água deionizada devido as características polares dos grupos funcionais presentes nas sementes de *Moringa oleifera*.

De acordo com a Figura 11, o condicionamento da adsorvente com H₂O deionizada não influenciou significativamente a extração. Durante o processo de extração também há a competição da água com o Cu(II) pelos os sítios de ligação. É possível observar que os sinais de eluição aumentou aproximadamente 4 vezes em relação ao sinal inicial (sem passar pelo DPX), evidenciando a pré-concentração de Cu(II).

Os experimentos subsequentes foram realizados sem a etapa de condicionamento do adsorvente.

Figura 11: Estudo do condicionamento do adsorvente. Condições preliminares: 4 mL Cu(II) 2,0 mg L⁻¹, 2 ciclos extração, 0,2 mL de eluente de HCl 0,5 mol L⁻¹, 15 mg de polpa de semente de *Moringa oleifera* a 250 µm.



5.2.3. Estudo do tamanho da partícula do adsorvente natural

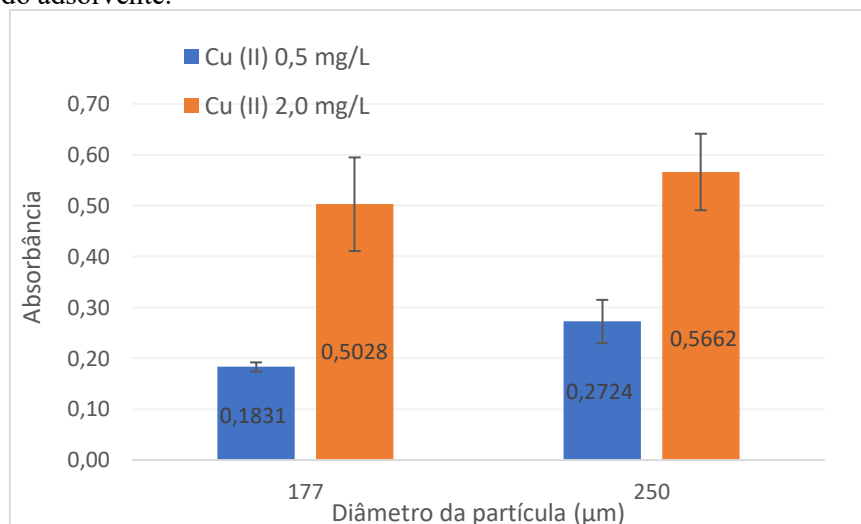
Os tamanhos de partículas influenciam na área superficial da fase sólida, além da heterogeneidade dos diâmetros poder influenciar na perda da reprodutibilidade dos resultados. Desse modo, foi estudado os diâmetros das partículas de 500, 250 e 177 µm, porém o diâmetro de 500 µm foi desconsiderado em estudo preliminar, devido a baixa eficiência de extração. Na Figura 12 são apresentados os resultados dos diâmetros de 250 e 177 µm. Uma solução de

Cu(II) de concentração mais baixa ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) foi avaliada afim de prevenir a saturação do material.

O tamanho de partícula de $250 \mu\text{m}$ apresentou melhores resultados para ambas as concentrações estudadas ($0,5$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Este resultado pode estar relacionado ao grau de empacotamento do adsorvente durante a eluição em diferentes tamanhos de partícula. O empacotamento do diâmetro de $250 \mu\text{m}$ favoreceu que o eluente percolasse de forma mais eficiente do que utilizando o tamanho de partícula $177 \mu\text{m}$. Uma maior área superficial deste último acarretou no aumento da pressão no sistema, o que pode explicar a pré-concentração mais baixa.

Em concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de íons Cu(II) em adsorvente a $250 \mu\text{m}$ teve um fator de pré-concentração maior (5,5) do que em uma solução com maior quantidade de analito ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) com um fator de pré-concentração de 2,6. Essa observação está relacionada ao aumento da concentração dos íons em solução, onde os sítios de adsorção se tornam menos disponíveis (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Figura 12: Estudo do tamanho de partícula. Condições preliminares: 4 mL da solução pH 6, 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eluente, 15 mg pó de semente de *Moringa oleifera*, sem condicionamento do adsorvente.



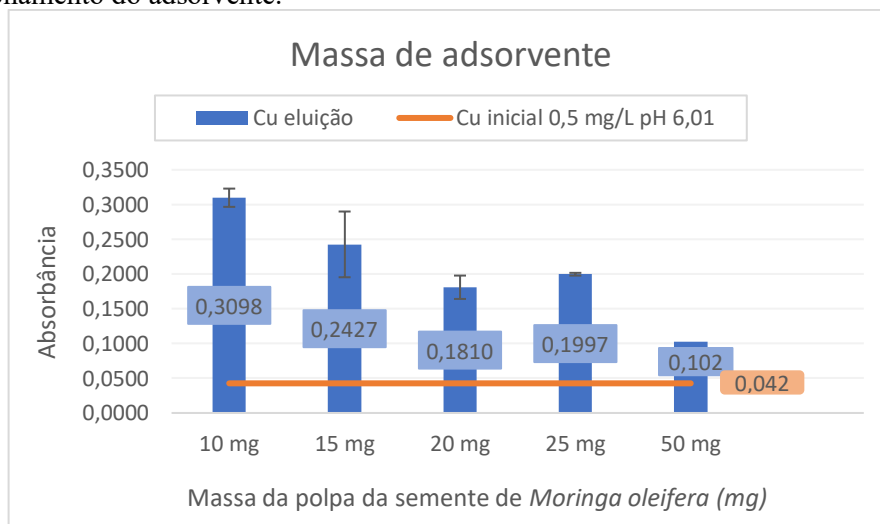
Dessa forma o diâmetro de partícula de $250 \mu\text{m}$ e concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ foram fixadas para os próximos experimentos.

5.2.4. Estudo da massa do adsorvente natural

A quantidade de massa do adsorvente é um parâmetro que afeta a adsorção. No entanto, o efeito da variação da massa do pó da polpa das sementes de *Moringa oleifera* foi investigado variando a quantidade de adsorvente de 10-50 mg.

De acordo com a Figura 13, a massa de 10 mg de fase sólida proporcionou melhores resultados, com uma pré-concentração de 7 vezes em relação ao valor do sinal inicial. Nota-se que com o aumento da massa de adsorvente houve um comprometimento significativo na eficiência de extração. Isso ocorre devido o aumento da massa limitar a dispersão efetiva do analito com o adsorvente dentro da capacidade interna do dispositivo, comprometendo o alcance do equilíbrio de adsorção (CORAZZA *et al.*, 2019).

Figura 13: Estudo da massa do adsorvente. Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L⁻¹ pH 6, 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ como eluente, tamanho de partícula de 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.



Dessa forma, todos os experimentos posteriores foram realizados usando a massa de 10 mg de polpa de semente de *Moringa oleifera*.

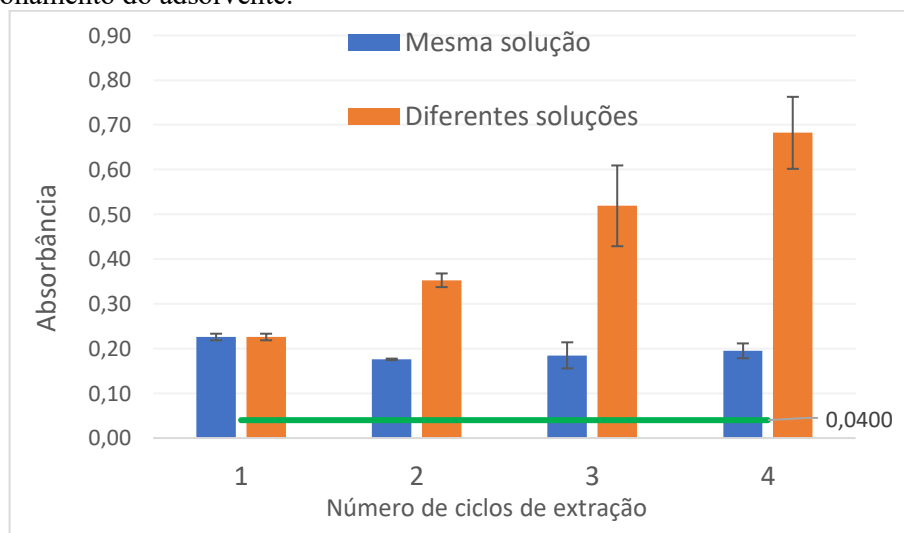
5.2.5. Estudo dos ciclos de extração

O ciclo de extração é um parâmetro muito importante na pré-concentração, pois é nessa etapa que ocorre a adsorção do cobre em solução. Cada ciclo de extração compõe o processo de aspiração da amostra, aspiração de ar e tempo de equilíbrio. Com o objetivo de aumentar a pré-concentração de analito, na etapa de extração foram realizados ensaios aspirando a mesma

alíquota remanescente da extração, bem como ensaios aspirando novas alíquotas a cada novo ciclo.

De acordo com a Figura 14, os resultados obtidos com a aspiração de novas alíquotas foram promissores em relação à pré-concentração. Os resultados mostram que a extensão de adsorção de íons Cu(II) foi aprimorada renovando-se a alíquota da solução aspirada a cada ciclo (aumento do sinal até 17,1 vezes), pois novas porções de analito estavam disponíveis para a extração. Já para os resultados obtidos a partir da mesma alíquota não foi observado variação significativa no enriquecimento do analito (aumento do sinal de 5,6 vezes em relação ao sinal inicial), uma vez que a quantidade de cobre remanescente na solução de origem não foi capaz de atingir a capacidade adsortiva da fase sólida (Fig. 14).

Figura 14: Estudo dos ciclos de extração. Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L⁻¹ pH 6; 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.



Dessa forma, realizou-se um estudo com uma variação maior do número de ciclos com diferentes soluções em busca da saturação do adsorvente.

5.2.6. Variação da quantidade de ciclos de extração com diferentes alíquotas

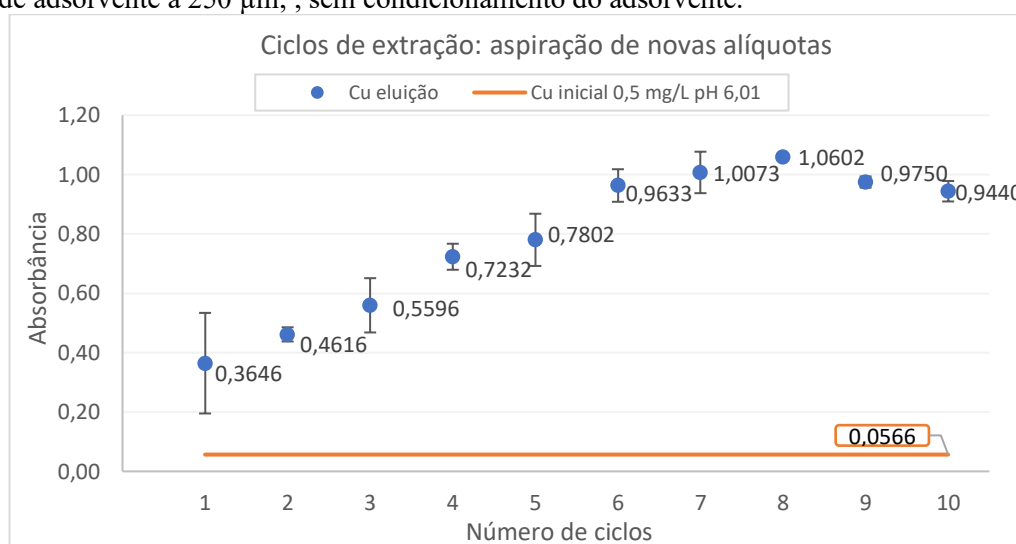
Foi realizado um novo estudo dos ciclos de extração aspirando novas alíquotas de solução de Cu(II) a cada novo ciclo com o intuito de alcançar a saturação do material e aumentar a pré-concentração de cobre por DPX.

De acordo com a Figura 15, pode-se observar um aumento significativo da pré-concentração com o aumento do número de ciclos em até 6 ciclos. A partir do sexto ciclo esse valor se manteve praticamente constante.

Alguns estudos com DPX na literatura apresentam ciclos de extrações com diferentes alíquotas de amostra como realizado por Corazza e colaboradores (2017; 2019) e Cadorim e colaboradores (2019). O alcance da saturação do material com a adição de novas porções de analito a partir de novas alíquotas é promissor na pré-concentração por DPX.

Dessa forma, verifica-se que a aspiração de 6 novas alíquotas em cada ciclo permitiu alcançar a saturação do material. Assim, 6 ciclos foram fixados para os próximos experimentos.

Figura 15: Variação da quantidade de ciclos de extração (novas alíquotas). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,5 mg L⁻¹ pH 6; 2 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, , sem condicionamento do adsorvente.



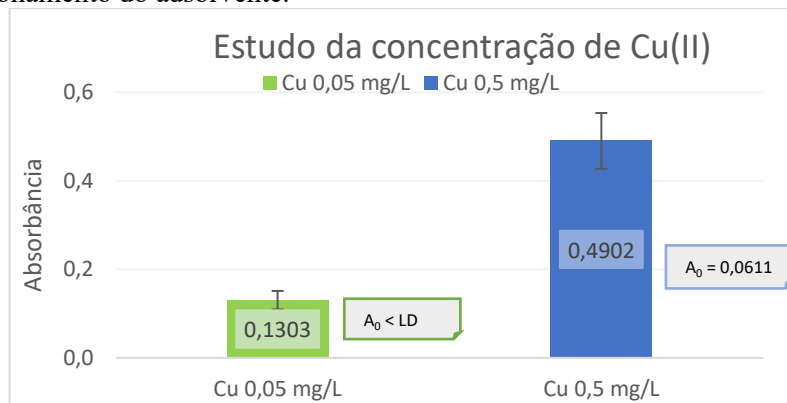
5.2.7. Estudo da concentração de Cu(II)

A concentração de Cu(II) foi reduzida a 0,050 mg L⁻¹ tendo em vista determinações a nível de µg L⁻¹ por F AAS, uma vez que sinais analíticos do experimento realizado foram promissores, além de se aproximarem das condições limites da Lei de Lambert-Beer (absorbância próxima de 1).

Os resultados da Figura 16 mostram que o emprego do procedimento DPX aumentou a detectabilidade de íons Cu(II) a 0,05 mg L⁻¹, com um sinal distinguível do branco (ABS = 0,1303 ± 0,0209; n = 3). Nessas condições, sem passar pelo DPX, a determinação direta não foi detectável.

Dessa forma, fixou-se a condição de concentração de íons Cu(II) de 0,05 mg L⁻¹ para os próximos experimentos.

Figura 16: Estudo da concentração de Cu(II). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,05 mg L⁻¹ pH 6; 6 ciclos extração, 0,2 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ como eluente, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.



5.2.8. Eluente: concentração e volume e número de ciclos

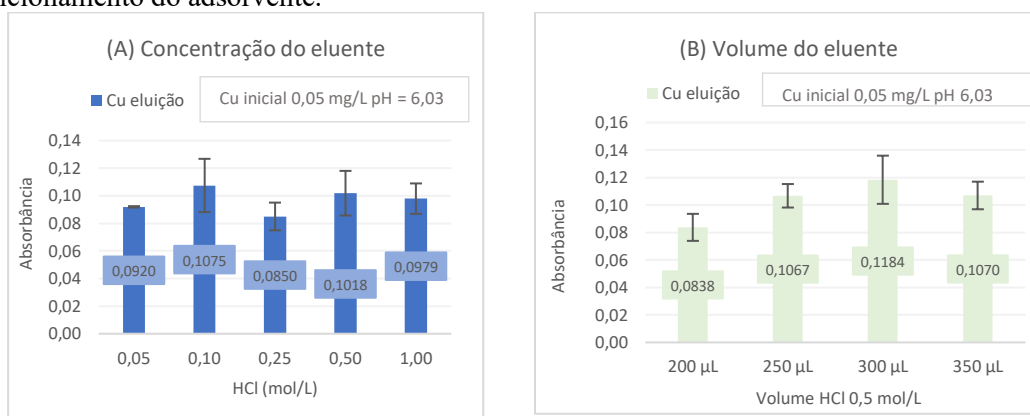
A solução de ácido clorídrico foi escolhida como melhor eluente (item 5.2.1). Outras condições de eluição, como concentração, volume e ciclos de eluição foram estudadas.

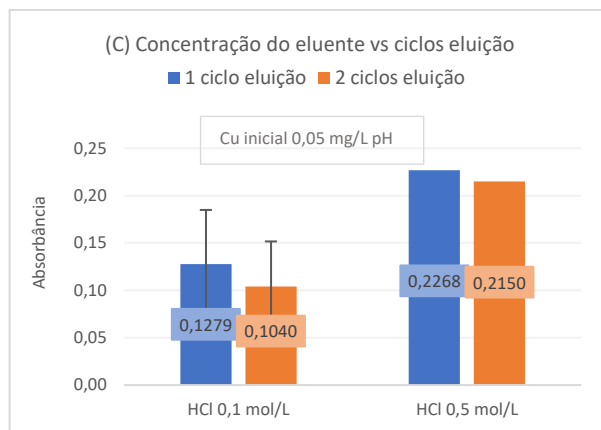
Na Figura 17 A, foi observado melhores resultados com 0,1 e 0,5 mol L⁻¹ de HCl. A concentração de 0,5 mol L⁻¹ foi escolhida devido a menor perca da precisão dos resultados em relação a 0,1 mol L⁻¹.

Na Figura 17 B, o volume de eluente de 250 µL foi escolhido. Volumes maiores não foram escolhidos, uma vez que poderiam afetar o fator de pré-concentração.

Na Figura 17 C, estudo dos ciclos de eluição, 1 ciclo foi escolhido, porque não houve diferença significativa com o aumento dos ciclos de eluição. O HCl a 0,5 mol L⁻¹ apresentou melhores resultados em relação ao HCl a 0,1 mol L⁻¹.

Figura 17: Estudo das condições de eluição. (A) Concentração da solução de HCl (0,05 – 1,0 mol L⁻¹) (B) Volume de HCl (200 – 350 µL) (C) Ciclos de eluição (1-2). Condições preliminares: 4 mL da solução de Cu(II) 0,05 mg L⁻¹ pH 6; 6 ciclos extração, 10 mg de adsorvente a 250 µm, sem condicionamento do adsorvente.

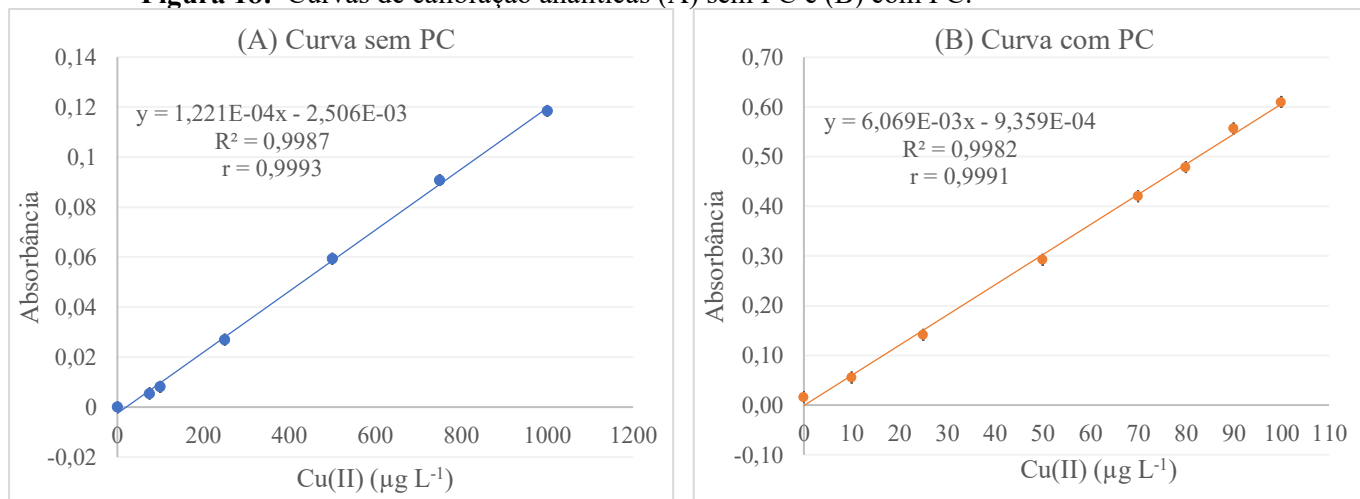




5.3. Resultados analíticos de validação

As Figuras 18 A e B apresentam os resultados das curvas de calibração analíticas sem pré-concentração (PC) e com PC de soluções aquosas de íons Cu(II), respectivamente. A curva com PC foi construída passando os padrões de íons Cu(II) ($n = 3$) e o branco (água deionizada) ($n = 10$) pelo procedimento DPX, nas condições otimizadas, e posterior análises dos eluatos. A curva sem PC foi construída por meio das análises diretas das soluções padrão de íons Cu(II) e do branco.

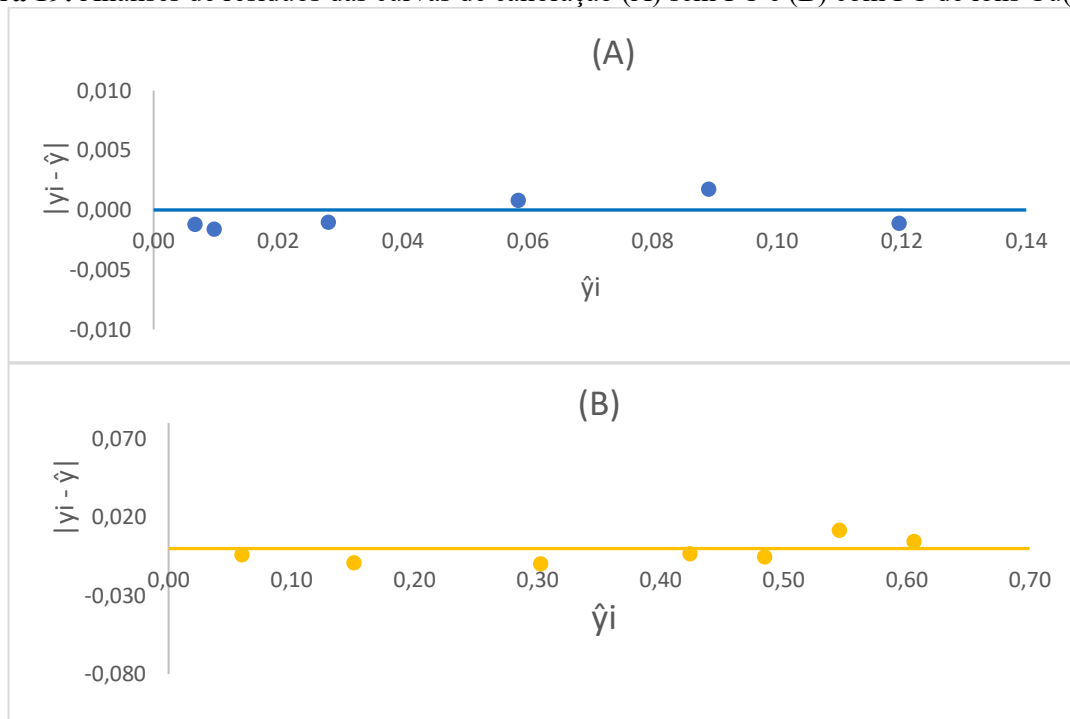
Figura 18: Curvas de calibração analíticas (A) sem PC e (B) com PC.



A curva de calibração com PC apresentou uma linearidade satisfatória de acordo com os parâmetros avaliados, com coeficiente de correlação, $r > 0,995$, valor do teste de Mandel representativo de função linear ($PG = 9,14 < F = 10,01$) (Tabela 8) e, de acordo com a Figura 19 B, uma distribuição aleatória dos resíduos. De acordo com a Tabela 8 e a Figura 19 A, a curva de calibração sem PC também apresentou linearidade adequada.

Tabela 7: Resultados das análises do teste de Mandel para as curvas de calibração sem PC e com PC de íons Cu(II).

Curva	PG experimental vs F
sem PC	PG experimental (0,042) < F (12,22)
com PC	PG experimental (9,14) < F (10,01)

Figura 19: Análises de resíduos das curvas de calibração (A) sem PC e (B) com PC de íons Cu(II).

O fator de enriquecimento (FE) foi calculado pela razão das inclinações das curvas com PC e sem PC obtendo um valor de 50. O ganho de sensibilidade obtido com a etapa de pré-concentração por DPX foi adequado para determinações de cobre em baixas concentrações e relevante quando comparado a outros procedimentos com PC de cobre, como em Neri e colaboradores (2019), Berkdemir e colaboradores (2019) e Suquila & Tarley (2019). Isso demonstra a importância do aproveitamento dos materiais naturais com propriedades adsorptivas para além do uso de fase sólidas sintéticas.

A Tabela 7 apresenta os resultados dos parâmetros de validação do procedimento DPX para Cu(II). Foram obtidos valores de LD e LQ satisfatórios para determinação de íons Cu(II) em água para hemodiálise dentro do limite tolerável pelas normas (Tabela 7).

Tabela 8: Figuras de Mérito do procedimento DPX otimizado para íons Cu(II) em meio aquoso.

	Curva com pré-concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva sem pré-concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
LD	0,64	49
LQ	2,1	148
Faixa linear	10-100	148-1000
Equação	$\text{Abs} = 6,069 \times 10^{-3} C_{\text{Cu(II)}} - 9,359 \times 10^{-4}$	$\text{Abs} = 1,221 \times 10^{-4} C_{\text{Cu(II)}} - 2,506 \times 10^{-3}$
r	0,9991	0,9993
Fator de enriquecimento	50	

A precisão foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (RSD) de amostras fortificadas em ensaios em condições de repetibilidade (pelo mesmo analista, mesmas condições operacionais e equipamentos, além de ter sido realizado no mesmo dia) onde foram analisadas 9 réplicas independentes de amostra de água para hemodiálise fortificada a uma concentração de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de íons Cu(II) obtendo um RSD de 6,2 % (Tab. 9). Esse valor foi considerado aceitável, pois procedimentos de extração de fase sólida estão muito suscetíveis a uma maior dispersão entre as réplicas, além de todo procedimento ter sido realizado em batelada.

A exatidão do procedimento de extração e pré-concentração DPX foi avaliada em termos da recuperação do analito na água para hemodiálise. Assim, a amostra coletada foi fortificada em dois níveis de concentrações de Cu(II) ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ e $80 \mu\text{g L}^{-1}$) e submetidas ao procedimento DPX otimizado. De acordo com a Tabela 9 foi observado resultados de recuperações próximas a 100% e com baixos desvios ($< 10\%$), demonstrando uma exatidão satisfatória. Consequentemente, esses valores indicam que também não foram observadas interferências da matriz da amostra.

Verificou-se que a amostra de água para hemodiálise não apresentou teores de cobre detectáveis ($< \text{LD}$). O baixo LD do procedimento DPX não representa um risco clínico de contaminação por Cu(II). Assim, esse procedimento DPX se mostra promissor para determinações seguras e satisfatórias de Cu(II) durante o monitoramento clínico de amostras de água para hemodiálise.

Tabela 9: Recuperação de íons Cu(II) em amostras água para hemodiálise pelo procedimento DPX.

Concentração fortificada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
-	$< \text{LQ}$	-	5,2
30,0	$29,05 \pm 0,01$	92,9	7,8
80,0	$80,31 \pm 0,03$	100,5	6,2

6. CONCLUSÕES

O procedimento desenvolvido usando a DPX com os dispositivos de ponteiros de micropipetas e a polpa das sementes de *Moringa Oleifera* Lam. como fase sólida foi eficiente na determinação de íons Cu(II) em água para hemodiálise a níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, com detecção por F AAS. O dispositivo DPX proposto é de fácil operação, simples e baixo custo.

O adsorvente natural “*in natura*” passou por processos simples de trituração, secagem e classificação granulométrica, sendo que a heterogeneidade da partículas não comprometeu a precisão e recuperação durante a etapa de validação.

A polpa das sementes de *Moringa* apresentou grupos funcionais e perfil morfológico superficiais que favorecem a adsorção de íons metálicos.

A adsorção de íons Cu(II) no pó da polpa das sementes de *Moringa* oleifera é favorecida em pH 6 (pH_{PCZ} 4,2) não necessitando de ajuste de pH para pré-concentração em água para hemodiálise.

O procedimento possibilitou bons resultados com baixas quantidades de adsorvente (10 mg com diâmetro de 250 μm), permitindo o consumo de baixos volumes de eluente (250 μL de HCl 0,5 mol L^{-1}).

A pré-concentração de Cu(II) foi aumentada devido a inserção de novas alíquotas de amostra em cada ciclo de extração até 6 ciclos consecutivos.

A curva de calibração com pré-concentração apresentou uma linearidade satisfatória, obtendo $r > 0,995$, distribuição aleatória de resíduos e teste de Mandel que indicam que a regressão linear utilizada é adequada.

Os limites de detecção (0,64 $\mu\text{g L}^{-1}$) e quantificação (2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram satisfatórios e coerentes com a quantidade de íons Cu(II) permitido na amostra de água para hemodiálise, demonstrando aplicabilidade e segurança do procedimento proposto. A faixa linear da curva com PC foi de 10 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu(II).

O procedimento DPX apresentou precisão ($\text{RSD} = 6,2 \%$, $n = 9$) e recuperação satisfatórias (92,9 – 100,5 %, $\text{RSD} < 10\%$). Os valores de recuperação indicam que não houve interferências da matriz da amostra.

A amostra de água para hemodiálise não apresentou teores de cobre detectáveis ($< \text{LD}$). O baixo LD do procedimento DPX não representa um risco clínico de contaminação por Cu(II), sendo que o procedimento DPX se mostra promissor para determinações seguras e satisfatórias de Cu(II) durante o monitoramento clínico de amostras de água para hemodiálise.

REFERÊNCIAS

- ABUALHASAN, M.; BASIM, A.; SALAHAT, A.; SOFAN, S.; AL-ATRASH, M. Quality of water used in palestinian hemodialysis centers. **Public Health**, 165, 136-141, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.09.015>.
- ACHEAMPONG, M. A.; PEREIRA, J. P. C.; MEULEPASA, R. J. W.; LENSEA, P. N. L. Biosorption of Cu(II) onto agricultural materials from tropical regions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 1184-1194, 2011. <https://doi.org/10.1002/jctb.2630>.
- AGUIAR JÚNIOR, C. A. S.; DOS SANTOS, A. L. R.; DE FARIA, A. M. Disposable pipette extraction using a selective sorbent for carbendazim residues in orange juice. **Food Chemistry**, v. 309 (125756), 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125756>.
- ALMODOVAR, A. A. B.; BUZZO, M. L.; DE LIMA e SILVA, F. P.; HILINSKI, E. G.; BUGNO, A. Efetividade do programa de monitoramento da qualidade da água tratada para diálise no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 40, n. 4, 344-350, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0026>.
- AL-RASHDI, A. A.; GAHLAN, A. A.; FARGHALY, O. A. Selective preconcentration of ultra trace copper (II) ion using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry at modified carbon past electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 15, n. 1, p. 977-989, 2020. <https://doi.org/10.20964/2020.01.83>.
- ALSHARAA, A.; BASHEER, C.; ADIO, S. O.; ALHOOSHANI, K.; LEE, H. K. Removal of haloethers, trihalomethanes and haloketones from water using *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, p. 2609–2618, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1079-z>.
- ALVES, V. **Desenvolvimento de Métodos de Extração em fase sólida para especiação de cromo e arsênio empregando sementes de *Moringa oleifera* como bioadsorvente**. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2013. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17516>.
- ALVES, V. N.; MOSQUETTA, R.; COELHO, N. M. M.; BIANCHIN, J. N.; ROUX, K. C. Di P.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Determination of cadmium in alcohol fuel using *Moringa oleifera* seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. **Talanta**, v. 80, p. 1133-1138, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.040>.
- ALVES, V. N.; BORGES, S. S. O.; NETO, W. B.; COELHO, N. M. M. Determination of low levels of lead in beer using solid-phase extraction and detection by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, 1-6, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/464102>.
- ALVES, V. N.; COELHO, N. M. M. Selective extraction and preconcentration of chromium using *Moringa oleifera* husks as biosorbent and flame atomic absorption Spectrometry.

Microchemical Journal, v. 109, p. 16-22, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.030>.

ALVES, V. N.; NERI, T. S.; BORGES, S. S. O.; CARVALHO, D. C.; COELHO, N. M. M. Determination of inorganic arsenic in natural waters after selective extraction using *Moringa oleifera* seeds. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 431-435, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.007>.

ARAUJO, C. S. T. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Extração e Pré-concentração de Ag(I) utilizando a *Moringa Oleifera* Lam.** Tese (Doutorado em Ciência) – Programa de Pós Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2009. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17495>.

ARAUJO, C. S. T.; ALVES, V. N.; REZENDE, H. C.; COELHO, N. M. M. Development of a flow system for the determination of low concentrations of silver using *Moringa oleifera* seeds as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 82-85, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.002>.

ARAUJO, C. S. T.; ALVES, V. N.; REZENDE, H. C.; ALMEIDA, I. L. S.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N.; TARLEY, C. R. T.; SEGATELLI, M. G.; COELHO, N. M. M. Characterization and use of *Moringa oleifera* seeds as biosorbent for removing metal ions from aqueous effluents. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 9, p. 2198-2203, 2010. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.419>.

BARCELOS, T. D. J. **Cobre: Vital ou Prejudicial para a Saúde Humana?** Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2008.
<http://hdl.handle.net/10400.6/747>.

BERKDEMIR, V.; TOKALIOGLU, S.; YILDIZ, S.; PATAT, S. Dispersive solid phase extraction of copper and lead from water and lichen samples with an activated carbon@Fe/Mn/O composite derived from sucrose-based activated carbon. **Analytical Methods**, v. 11, p. 5311-5319, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9AY01897B>.

BORDIN, D. C. M.; ALVES, M. N. R.; CABRICES, O. G.; DE CAMPOS, E. G.; DE MARTINIS, B. S. A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatographymass spectrometry (GCMS). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 31-38, 2013. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt092>.

BORDIN, D. C. M.; ALVES, M. N. R.; DE CAMPOS, E. G.; DE MARTINIS, B. S. Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1168-1172, 2016. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500932>

BRASIL. Guia para Qualidade em Química Analítica. Uma assistência a Acreditação. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, 2004.
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/laboratorios.pdf>.

BRASIL. Guia para Qualidade em Química Analítica. Uma assistência à Habilitação. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, 2005.
<https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Guia-Qualidade-em-QA-Anvisa.pdf>.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de diálise e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, DF, 14 de março de 2014.

<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-11-de-13-de-marco-de-2014>.

BRASIL. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos - documento de caráter orientativo. **Coordenação Geral de Acreditação (DOQ-CGCRE-008)**, INMETRO, rev. 05, ago. 2016.

http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf.

BRASIL. Justificativas para os limites mínimos e máximos de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas da proposta regulatória de suplementos alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, DF, janeiro de 2018.

BRASIL. Instrução Normativa (IN) nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, DF, 26 de julho de 2018. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380639/do1-2018-07-27-instrucao-normativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550.

BRAIMOH, R. W.; MABAYOJE, M. O.; AMIRA, C. O.; COKER, H. Quality of hemodialysis water in a resource-poor country: the nigerian example. **Hemodialysis International**, v. 16, p. 532-538, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2012.00682.x>.

BREWER, W. E.; ELLISON, S. T.; MORGAN, S. L.; FOSTER, F. D. Rapid extraction and automated chromatographic analysis of drugs and metabolites from biological specimens using disposable pipette extraction (DPX). **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 6, p. A48-A48, 2009.

BREWER, G. J. Copper toxicity in Alzheimer's disease: cognitive loss from ingestion of inorganic copper. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 89-92, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.019>.

CADORIM, H. R.; SCHNEIDER, M.; HINZ, J.; LUVIZON, F.; DIAS, A. N.; CARASEK, E.; WELZ, B. Effective and high-throughput analytical methodology for the determination of lead and cadmium in water samples by disposable pipette extraction coupled with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS). **Analytical Letters**, v. 52, n. 13, p. 2133-2149, 2019. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1596117>.

CARVALHO, G. C.; BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; DE LIMA E SIVA, F. P.; PINTO, T. de J. A. Validation and applicability of an alternative method for dialysis water and dialysate quality analysis. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 42, p. 163-174, 2020. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2019-0203>.

CASTILLO-CASTAÑEDA, P. C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, A.; BENCOMO-ALVAREZ, A. E.; BARROS-NUÑEZ, P.; GAXIOLA-ROBLES, R.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C.;

ZENTENO-SAVÍN, T. Micronutrient content and antioxidant enzyme activities in human breast milk. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 51, p. 36-41, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.09.008>.

CONRADO, J. A. M. **Microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de ftalatos em água de hemodiálise por CG/FID**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2019. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27538>.

CORAZZA, G.; MERIB, J.; DO CARMO, S. N.; MENDES, L. D.; CARASEK, E. Assessment of a fully optimized DPX-based procedure for the multiclass determination of pesticides in drinking water using high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30, n. 6, p. 1211-1221, 2019. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190016>.

CORAZZA, G.; MERIB, J.; MAGOSSO, H. A.; BITTENCOURT, O. R.; CARASEK, E. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 42-50, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.050>.

COSTA, E. C.; BARBOSA, C. D' A. do E. S.; GARCIA, H. L.; GARCIA, C. A. B. Pó das sementes de *Moringa oleifera* como adsorvente de poluentes metálicos. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, 2013. <https://ri.ufs.br/handle/riufs/1803>.

COSTA, B. E. dos S. **Especiação Química de Arsênio em amostras de arroz empregando extração por fase sólida *in-situ* e Determinação por FI-HG AAS**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.811>.

COSTA, P. S. B.; OLIVEIRA, L. T.; PEDROSO, R. S.; TOSTA, P. O. ; MARTINS, C. H. G.; JAMUR, M. C.; PIRES, R. H. Single-species (bacterial, fungal, or mycobacterial) biofilms or dual-species (mycobacterial-fungal) biofilms formed in dialysis fluids. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96 (114870), 2020. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114870>.

DE OLIVEIRA, A. F.; DA SILVA, C. S.; BIANCHI, S. R.; NOGUEIRA, A. R. A. The use of diluted formic acid in sample preparation for macro and microelements determination in foodstuff samples using ICP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 7-12, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.001>.

DE SOUSA, M. R. G.; SILVA, A. E. B. de C.; BEZERRA, A. L. Q.; DE FREITAS, J. S.; MIASSO, A. I. Eventos adversos em hemodiálise: relatos de profissionais de enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, n. 1, p. 75-82, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342013000100010>.

DIAS, F. de S.; NETO, S. C. de S. R.; PIRES, L. de N.; LEMOS, V. A. Emulsification solidified floating organic drop microextraction assisted by ultrasound for the determination of nickel, cobalt and copper in oyster and fish samples. **Analytical Methods**, v. 12, p. 865-871, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9AY02453K>.

DO CARMO, S. N.; DAMÁSIO, F. Q.; ALVES, V. N.; MARQUES, T. L.; COELHO, N. M. M. Direct determination of copper in gasoline by flame atomic absorption spectrometry after sorption and preconcentration on *Moringa oleifera* husks. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 320-325, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.04.010>.

DO CARMO, S. N. **Extração seletiva de Mn (II) utilizando sementes de *Moringa oleifera* como bioadsorvente**. Dissertação (Mestre em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2014. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17422>.

DO CARMO, S. N.; NETO, J. A. de S.; ALVES, V. N.; COELHO, L. M.; COELHO, N. M. M. Selective extraction of manganese using *Moringa oleifera* seeds as bioadsorbent. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 24, p. 27-37, 2019. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.AR-10-2019>.

DO NASCIMENTO, R. F.; DE LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. de Q.; RAULINO, G. S. C. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/10267>.

ELLISON, S. T.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L. Comprehensive analysis of drugs of abuse in urine using disposable pipette extraction. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 356-365, 2009. <https://doi.org/10.1093/jat/33.7.356>.

ENVIROMENT HEALTH CRITERIA 200 (EHC). **International Programme on Chemical Safety**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>. Acesso em: 15 abr. 2020.

ERBAS, Z.; SOYLAK, M.; OZDEMIR, S.; KILINC, E. Fe₃O₄@SiO₂@*Bacillus pumilis*: magnetised solid phase bio-extractor for preconcentration of Pb(II) and Cu(II) from water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 11, p. 1112-1122, 2019. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1616710>.

EURACHEM GUIDE - MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (ed.). **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A laboratory guide to method validation and related topics**. 2. ed. 2014.

FARAJI, M.; POURMOHAMMAD, M.; ARYANASAB, F.; SHABANIAN, M. (4-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)methyl pyrrolidine-1-carbodithioate as a novel, highly selective and sensitive ligand for determination of copper in water and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with microvolume UV-Vis spectrophotometry. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 16, n. 8, p. 1579-1589, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01616-3>.

FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 2, p. 376-382, 2013. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200673>.

FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Comparison of disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction in the

quechers method for analysis of pesticides in strawberries. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 10, p. 1339-1345, 2014. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu003>.

FERNANDES, A. R.; DE SOUZA, P. S.; DE OLIVEIRA, A. E.; CHAVES, A. R. A New method for the determination of creatinine in urine samples based on disposable pipette extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 695-700, 2018. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170187>.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. de A.; CARVALHO, A. de F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000400007>.

FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG, E. Adsorventes naturais como controladores de poluentes aquáticos: uma revisão. **Revista EIXO**, v. 2, n. 1, p. 39-52, 2013. <https://doi.org/10.19123/eixo.v2i1.105>.

GALAO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de *Moringa*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n.1, p. 106-109, 2006. <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/224/219>.

GAETKE, L. M.; CHOW-JOHNSON, H. S.; CHOW, C. K. Copper: toxicological relevance and mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 88, p. 1929-1938, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>.

GERDES, G. Como limpar e tratar água suja com sementes da *Moringa*. Technical Bulletin. Fortaleza: ESPLAR - Centro de Pesquisa e Assessoria; 1997.

GIACOMINI, F.; MENEGAZZO, M. A. B.; DA SILVA, A. B.; DA SILVA, M. G. Determinação do ponto de carga zero como característica importante no tingimento de fibras proteicas. In: **CONGRESSO CIENTÍFICO TÊXTIL E MODA**, 5º, abr. 2017, Centro Universitário FEI - Campus São Paulo. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620170002.0159>.

GUAN, H. X.; BREWER, W. E.; GARRIS, S. T.; MORGAN, S. L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 12, p. 1867-1874, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.047>.

GUARIEIRO, L. L. N.; PINTO, A. C.; DE AGUIAR, P. F.; RIBEIRO, N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel:diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Química Nova**, vol. 31, n. 2, 421-426, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200041>.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). **European Medicines Agency (EMA)**, 2006. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.

IMRAN, K.; HARINATH, Y.; NAIK, B. R.; KUMAR, N. S.; SESHIAH, K. A new hybrid sorbent 2,2'-pyridil functionalized SBA-15 (Pyl-SBA-15) synthesis and its applications in

solid phase extraction of Cu(II) from water samples. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103170>.

IUPAC. THOMPSON, M. ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **IUPAC, Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.

JAISON, P. G.; KUMAR, P.; TELMORE, V. M.; AGGARWAL, S. K. Electrospray ionisation mass spectrometric studies for the determination of palladium after pre-concentration by disposable pipette extraction. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 17, p. 1971-1979, 2012.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: BORGES, K. B.; DE FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 62-68.

KANSAL, S. K.; KUMARI, A. Potential of *M. oleifera* for the treatment of water and wastewater. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 4993–5010, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400093w>.

KONATU, F. R. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. Revisiting quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe parameters for sample preparation in pesticide residue analysis of lettuce by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 11-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.061>.

KOVALENKO, O.; NOVOSELTSEVA, V.; KOVALENKO, N. Biosorbents - prospective materials for heavy metal ions extraction from wastewater. **Food Science and Technology**, v. 11, 2017. <https://doi.org/10.15673/fst.v12i1.841>.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M. M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. **International Journal of Mineral Processing**, v. 78, p. 131-139, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2005.10.001>.

MAFRA, G.; SPUDEIT, D.; BROGNOLI, R.; MERIB, J.; CARASEK, E. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1102, p. 159-166, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.021>.

MATERIAL DE APOIO COMPLEMENTAR. **Curso de Validação de Métodos Analíticos e Controle de qualidade: Parâmetros de Quantificação**. Universidade do Minho, Ensino à Distância, 2017.

MCGILL, R. L.; WEINER, D. E. Dialysate composition for hemodialysis: changes and changing risk. **Seminars in Dialysis**, v. 30, p. 112–120, 2017.

MEHRANI, Z.; EBRAHIMZADEH, H.; ASGHARINEZHAD, A. A.; MORADI, E.; Determination of copper in food and water sources using poly *m*phenylenediamine/

CNT electrospun nanofiber. **Microchemical Journal**, v. 149 (103975), 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103975>.

MORÉS, L.; DA SILVA, A. C.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. A natural and renewable biosorbent phase as a low-cost approach in disposable pipette extraction technique for the determination of emerging contaminants in lake water samples. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 7, p. 1404-1411, 2019. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801005>.

NEVES, P. D. M. de M.; SESSO, R. de C. C.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; NASCIMENTO, M. M. Censo Brasileiro de Diálise: análise de dados da década 2009-2018. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 42, n. 2, p. 191-200, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2019-0234>.

NASCIMENTO, C. D; MARQUES, I. R. Intervenções de enfermagem nas complicações mais frequentes durante a sessão de hemodiálise: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 58, n. 6, p. 719-722, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672005000600017>.

NEFROCOR. **O que é solução de diálise – Dialisato?** Disponível em <http://www.nefroc.or.br/conteudo-informacoes-sobre-dialise-e-hemodialise.php>. Acesso em: 09 ago. 2020.

NERI, T. S.; ROCHA, D. P.; MUÑOZ, R. A. A.; COELHO, N. M. M. BATISTA, A. D. Highly sensitive procedure for determination of Cu(II) by GF AAS using single-drop microextraction. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 894-898, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.014>.

OENNING, A. L.; MERIB, J.; CARASEK, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, p. 459-465, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.047>.

OLIVEIRA, J. de A. N.; SIQUEIRA, L. M. C.; NETO, J. A. de S.; COELHO, N. M. M.; ALVES, V. N. Preconcentration system for determination of lead in chicken feed using *Moringa oleifera* husks as a biosorbent. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 327-332, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.001>.

OLIVEIRA, I. G. D.; MARCHIONI, C.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of anandamide in cerebrospinal fluid samples by disposable pipette extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1130, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121809>.

PALIWAL, R.; SHARMA, V.; PRACHETA. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): a multipurpose tree with high economic and commercial importance. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 317-328, 2011. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.317.328>.

PALUCH, J.; MESQUITA, R.B.R.; CERDÁ, V.; KOZAK, J.; WIECZOREK, M.; RANGEL, A. O. S. S. Sequential injection system with in-line solid phase extraction and soil mini-column for determination of zinc and copper in soil leachates. **Talanta**, v. 185, p. 316-323, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.091>.

PEIXOTO, R. R. A.; CODO, C. R. B.; SANCHES, V. L.; GUIRALDELO, T. C.; DA SILVA, F. F.; RIBESSI, R. L.; MARBA, S. T. M.; CADORE, S. Trace mineral composition of human breast milk from Brazilian mothers. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 199–205, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.002>.

PEREIRA, F. S. G. **Viabilidade sustentável de biomassas de *Moringa oleifera* para produção de biodiesel e briquetes**. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2015. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/15071>.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101-108, 2015.

PINTO, M. A. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.052>.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose indian vegetable. **Economy Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980. <https://doi.org/10.1007/BF02858648>.

RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE). **Guia RELACRE 13 - Validação de métodos Internos de ensaios químicos**. Portugal, fev. 2000. <http://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>.

ROBLES, J. O.; REGALBUTO, J. R. The engineering of Pt/Carbon catalyst preparation for application on proton exchange fuel cell membrane (PEFCM). **REU 2004 Summer Program from University of Illinois at Chicago**, 2004. https://amrel.bioe.uic.edu/NSFREU2004/Reports2004/Jaime%20Robles_Final%20Report.pdf

RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA W. Cobre. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012. http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_3/10-EQ-37-10.pdf.

ROHANI, T.; MOHAMMADI, S. Z.; ZADEH, N. G. Sensitive detection of trace amounts of copper by a dopamine modified carbon ceramic electrode. **Polyhedron**, v. 168, p. 88-93, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.03.053>.

ROLDAN, P. dos S.; KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. de A. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica empregando filamentos de tungstênio. **Revista Analytica**, n. 25, p. 58-68, 2006. https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/joaquim_Filamento.pdf.

SARGENT, J. A.; MARANO, M.; MARANO, S.; GENNARI, F. J. Changing dialysate composition to optimize acid-base therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 32, p. 248-254, 2019. <https://doi.org/10.1111/sdi.12779>.

SHAIKH, A. B.; BARACHE, U. B.; ANUSE, M. A.; GAIKWA, S. H. 4-(4'-Nitrobenzylideneimino)-3-methyl-5-mercapto-1, 2, 4-triazole, A new chromogenic reagent for extractive spectrophotometric determination of copper (II) in pharmaceutical and alloy samples. **South African Journal of Chemistry**, v. 69, p. 157-165, 2016. <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2016/v69a19>.

SCHROEDER, J. L.; MARINETTI, L. J.; SMITH, R. K.; BREWER, W. E.; CLELLAND, B. L.; MORGAN, S. L. The analysis of delta(9)-tetrahydrocannabinol and metabolite in whole blood and 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using disposable pipette extraction with confirmation and quantification by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 659-666, 2008. <https://doi.org/10.1093/jat/32.8.659>.

SINOTI, A. L. L. **Água para hemodiálise**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Florianópolis - SC, 2010. PDF disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/informacoes-gerais-documentos/vigilancia-em-saude/ceciss/materiais-seminario-ceciss/ii-encontro-de-utis/palestras-2/3978-andre-luiz-lobes-sinoti-parte1/file#:~:text=Ag%C3%A2ncia%20Nacional.%20de%20Vigil%C3%A2ncia%20Sanit%C3%A1ria,http://www.anvisa.gov.br.%20Bras%C3%ADlia%20-%20DF,junho%20de%202002,Florian%C3%B3polis%20-%20SC%20Novembro%20de%202010>. Acesso em: 28 ago.2020.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5. ed. Bookman: São Paulo, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principios de análisis instrumental**. 6. ed. Santa Fé: Cengage Learning, 2008. p. 215 - 249.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **O que é hemodiálise**. Disponível em: <https://www.sbn.org.br/orientacoes-e-tratamentos/tratamentos/hemodialise/>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SONG, S.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; HE, F.; WEI, J.; TAN, H.; LI, X. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC-MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1557, p. 51-61, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.003>.

SUQUILA, F. A. C.; TARLEY, C. R. T. Performance of restricted access copper-imprinted poly(allylthiourea) in an on-line preconcentration and sample clean-up FIA-FAAS system for copper determination in milk samples. **Talanta**, v. 202, p. 460-468, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.023>.

SUZUKI, M. N.; FREGONESI, B. M.; MACHADO, C. S.; ZAGUI, G. S.; KUSUMOTA, L.; SUZUKI, A. K.; DA COSTA, J. A. C.; LLOPART, J. S.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. Hemodialysis Water Parameters as Predisposing Factors for Anemia

in Patients in Dialytic Treatment: Application of Mixed Regression Models. **Biological Trace Element Research**, v. 190, p. 30–37, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1515-7>.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.

TURAZZI, F. C.; MORÉS, L.; CARASEK, E.; MERIB, J.; BARRA, G. M. de O. A rapid and environmentally friendly analytical method based on conductive polymer as extraction phase for disposable pipette extraction for the determination of hormones and polycyclic aromatic hydrocarbons in river water samples using high-performance liquid chromatography/diode array detection. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103156>.

URBAN, R. C.; ROMERO J. R.; CAMPOS, M. L. A. M. Development of a portable sensor to evaluate copper speciation in natural waters. **Analytical Methods**, v. 10, p. 2056-2063, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8AY00414E>.

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) - Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. **Instituto Português da Qualidade (IPQ), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)**, 1. ed. Luso-Brasileira, 2012. http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf.

YABUTANI, T.; KISHIBE, S.; KAMIMURA, M.; NOZOE, K.; YAMADA, Y.; TAKAYANAGI, T. Copper speciation for natural water by on-site sample treatment/solid-phase extraction/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 34, 725-728, 2018. <https://doi.org/10.2116/analsci.18SBP08>.