

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ADRIANO FRANCISCO BARBOSA

***SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO
PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO DIRETAMENTE DE
AMOSTRAS DE SORO HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA***

ALFENAS/MG

2015

ADRIANO FRANCISCO BARBOSA

***SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO
PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO DIRETAMENTE DE
AMOSTRAS DE SORO HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA***

Tese apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química
Área de Concentração:
Química Analítica

Orientador: Prof. Dr Pedro Orival Luccas
Co-orientador: Prof. Dr Eduardo Costa de Figueiredo

ALFENAS/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Barbosa, Adriano Francisco.

Síntese e aplicação de nanotubos de carbono de acesso restrito para extração/pré-concentração de cádmio diretamente de amostras de soro humano seguido de análise por espectrometria de absorção atômica \ Adriano Francisco Barbosa. -- Alfenas/MG, 2015.

74 f.

Orientador: Pedro Orival Luccas

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. Nanotubos de Carbono. 2. Cádmio. 3. Soro. 4. Espectrometria. 5. Absorção Atômica. I. Luccas, Pedro Orival. II. Título.

CDD-543.1

ADRIANO FRANCISCO BARBOSA

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO
PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO DIRETAMENTE DE
AMOSTRAS DE SORO HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 12/03/2015

Prof.: Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. (a): Pedro Sérgio Fadini

Instituição: UFSCAR

Assinatura:

Prof. (a): Clésia Cristina Nascentes

Instituição: UFMG

Assinatura:

Prof. (a): Isarita Martins Sakakibara

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. (a): Célio Wisniewski

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico a minha amada esposa Valéria pelo amor, companheirismo e por todo apoio.

Aos meus pais, Aécio e Maria José pelo amor, carinho, compreensão e por serem meus exemplos.

A minha filha Ana Júlia que veio para nos mostrar o amor grandioso de Deus com seus filhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos me dando saúde, curiosidade e perseverança.

À Universidade Federal de Itajubá que foi fundamental para o início do Doutorado.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador, professor Dr. Pedro Orival Luccas, pela dedicação, apoio, amizade e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, pelo apoio, amizade, colaboração e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À mestrandia e esposa Valéria Maria Pereira Barbosa, pelo companheirismo até mesmo no laboratório na realização dos experimentos e pela colaboração e ajuda durante todo o trabalho.

À doutoranda Mariane Gonçalves Santos pela colaboração na coleta de amostras, aos colegas do LATF e do laboratório de Mineralogia.

Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram e apoiaram nessa jornada.

“Nunca nada grandioso no mundo foi feito sem uma grande dose de paixão”

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar ao contrário.”

Albert Einstein

RESUMO

Neste trabalho, foi proposto um novo adsorvente capaz de extrair íons metálicos diretamente de fluídos biológicos, excluindo simultaneamente, as proteínas das amostras. O adsorvente foi obtido pela modificação de nanotubos de carbono (CNTs) com uma camada externa de albumina de soro bovino (BSA), resultando nos nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs). A camada de BSA foi fixada pelo intercruzamento entre os grupos amina da BSA usando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada. Quando as proteínas das amostras passam por uma coluna contendo os RACNTs, e o pH da amostra é maior que o ponto isoelétrico (pI) das proteínas, as proteínas das amostras e da camada de BSA são ionizadas negativamente, provocando um efeito de repulsão eletrostática evitando a adsorção. Ao mesmo tempo, os íons metálicos são adsorvidos nos CNTs após a passagem através das cadeias de proteínas. Os íons Cd^{2+} foram selecionados para atestar a capacidade dos RACNTs devido à sua importância toxicológica. Os RACNTs foram capazes de extrair Cd^{2+} e excluir 100% das proteínas das amostras de soro humano. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,24 e 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A frequência de amostragem foi de 8,6 determinações por hora, e a precisão intra e inter-dias para as concentrações de Cd^{2+} de 0,80, 15,0 e 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram desvio padrão relativo (RSD) inferior a 10,1%. A recuperação dos analitos adicionados nas amostras de soro humano estudadas foram de 92,7 a 110,9%. O método apresentou-se adequado para sua aplicação na análise de Cd^{2+} diretamente de amostras de soro humano sem a necessidade de nenhuma etapa prévia de tratamento das amostras.

Palavras-chave: Nanotubos de Carbono, material de acesso restrito, nanotubos de carbono de acesso restrito, cádmio, soro humano, espectrometria de absorção atômica.

ABSTRACT

In this paper, we proposed a new sorbent able to extract metal ions directly from untreated biological fluids, excluding simultaneously all the proteins from these samples. The sorbent was obtained through the modification of carbon nanotubes (CNTs) with an external bovine serum albumin (BSA) layer, resulting in a restricted access carbon nanotube (RACNT). The BSA layer was fixed through the interconnection between the amines groups of the BSA by using glutaraldehyde as cross-linked reagent. When a protein sample pass through a cartridge containing RACNTs, if the sample pH is larger than the isoelectrical point of the proteins, both proteins from the sample and from the BSA layer are negatively ionized and its causes electrostatics repulsion between them. At the same time, the metal ions are adsorbed in the CNTs after their passage through the chains of proteins. The Cd^{2+} ion was selected for a proof-of-principle case to test the suitability of the RACNTs due to its toxicological relevance. RACNT was able to extract Cd^{2+} and to exclude about 100% of the proteins from the human serum samples. The limits of detection and quantification were 0.24 and 0.80 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The sampling frequency was 8.6 determinations/h, and the intra and inter-day precisions at the 0.80, 15.0 and 30.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd^{2+} levels were lower than 10.1% (RSD). The recoveries of spiked analytes in the human blood serum samples studied ranged from 93.4 to 110.9%. The method was successfully applied to analyze Cd^{2+} directly from human blood serum samples without any pretreatment.

Keywords: carbon nanotube, restricted access material, restricted access carbon nanotube, cadmium, human serum, atomic absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do sistema de extração/pré-concentração “online” com emprego dos RACNT para determinação de Cd^{2+}	35
Figura 2. Ilustração da reação de inter cruzamento da BSA na formação do recobrimento sobre os CNTs ¹⁶⁷	38
Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura (a e b) e micrografias eletrônicas de transmissão (c - f) dos CNTs (a, c, e) e RaCNTs (b, d, f).....	40
Figura 4. Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) para: BSA, CNTs (puros e oxidados) e RACNTs.....	41
Figura 5. Ensaio de exclusão de proteínas em sistema de HPLC com detecção a 280 nm. a) Pico de referência onde não há coluna no sistema, com colunas empacotadas com RACNTs (b) e CNTs (c).....	42
Figura 6. Efeito do tempo de agitação na adsorção de Cd^{2+} (50 mg L^{-1} ; pH 7,00; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) nos CNTs e RACNTs.....	43
Figura 7. Comportamento da adsorção de íons Cd^{2+} (concentração estudadas na faixa de 5 – 300 mg L^{-1} pH 7,00, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) nos adsorventes CNTs e RACNTs.	44
Figura 8. Aplicação dos modelos lineares de Langmuir (a e c) e Freundlich (b e d) para os dados obtidos nos ensaios de isotermas para os CNTs (a e b) e RACNTs (c e d).....	45
Figura 9. Efeito do pH da solução de tampão e da amostra na absorbância (área de pico).	48
Figura 10. Representação esquemática dos RACNTs e seu princípio básico de funcionamento.	49
Figura 11. Efeito da concentração de tampão fosfato na extração/pré-concentração de Cd^{2+} na absorbância (área de pico).....	51
Figura 12. Resposta de absorção atômica e molecular para a injeção de amostra de soro humano (diluído 3:7 em tampão fosfato) fortificado com $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} no sistema otimizado. BG é o sinal de fundo para o sistema de detecção por TS-FF-AAS.	52
Figura 13. Curva analítica (a) e respectivos registos de sinal (b) para extração/pré-concentração de Cd^{2+} em RACNTs para padrões preparados em “pool” de soro humano 3:7 (v/v) em tampão fosfato. OBS: O Diagrama (b) corresponde ao registro dos sinais a partir de 1 min de cada medida não representando o tempo total de análise.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores ⁴¹ , e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores ⁴² e pelos autores do trabalho.....	21
Tabela 2. Resumo de algumas aplicações de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas.	25
Tabela 3. Parâmetros dos modelos matemáticos de Lagmuir e Freundlich obtidos para os CNTs e RACNTs e seus respectivos erros.	46
Tabela 4. Parâmetros analíticos para extração e determinação direta de Cd ²⁺ de amostras de soro humano usando o método proposto.....	55
Tabela 5. Determinação de Cd ²⁺ em amostras de soro humano pelo método proposto e pelo método convencional de TS-FF-AAS após mineralização, n=3.	57
Tabela 6. Comparação de diferentes métodos de espectrometria de absorção atômica para análise de Cd ²⁺ em fluídos proteicos.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ANALITOS INORGÂNICOS ENCONTRADOS EM NÍVEIS TRAÇOS	14
2.2	REAGENTES SÓLIDOS NA SEPARAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ANALITOS INORGÂNICOS	16
2.2.1	<i>Nanotubos de carbono na separação/pré-concentração de analitos inorgânicos</i>	17
2.2.2	<i>Materiais de acesso restrito</i>	19
2.3	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO EM SISTEMAS DE EXTRAÇÃO/ PRÉ- CONCENTRAÇÃO COM REAGENTE SÓLIDO.....	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODO	32
4.1	INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS.....	32
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	33
4.3	PREPARO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO	33
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS E NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO	34
4.5	SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO COM EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM LINHA .	35
4.6	OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO SISTEMA FIA	36
4.7	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	36
4.8	TRATAMENTO DOS DADOS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	38
5.2	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FLUXO	46
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO E APLICAÇÕES	54
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A determinação de íons metálicos em níveis traços e ultra-traços em amostras ambientais, biológicas, de alimentos e em materiais de alta pureza é muito importante na proteção ambiental, na prevenção de doenças e proteção da saúde da população, e controle de qualidade de materiais. No entanto a baixa concentração dos analitos assim como interferências de matriz, torna a determinação destes íons limitada exigindo que os métodos analíticos apresentem cada vez menor detectabilidade e sejam mais seletivos^{1,2}.

Apesar dos grandes avanços tecnológicos na área de instrumentação analítica, a determinação de elementos traços e ultra-traços ainda apresenta grandes desafios relacionados à detectabilidade, sensibilidade e seletividade dos métodos e altos custos operacionais de alguns equipamentos. Para contornar tais problemas, tem se desenvolvido procedimentos analíticos combinados com instrumentação eficiente mediante ao uso de métodos caracterizados por adequada detectabilidade, precisão, exatidão, frequência analítica e simplicidade operacional.

Nesse sentido, visando obter menores limites de quantificação e maximizar a sensibilidade e/ou seletividade de sistemas analíticos, a literatura de química analítica tem reportado vários procedimentos para extração e/ou pré-concentração de elementos traços e ultra-traços de acordo com a natureza das amostras, a concentração do analito, interferentes de matriz e os métodos de detecção.

Dentre estes procedimentos, podemos citar a co-precipitação, pré-concentração eletroquímica, extração líquido-líquido (envolvendo a extração por ponto nuvem e membranas líquidas) e extração em fase sólida (SPE). A SPE destaca-se por apresentar características como, elevados fatores de pré-concentração, fácil regeneração da fase sólida, maior frequência analítica, e a capacidade de combinação de diferentes técnicas de detecção “on-line” ou “off-line”³.

Nos últimos anos os nanotubos de carbono têm se destacado como reagente sólido na extração e pré-concentração de analitos orgânicos e inorgânicos no desenvolvimento de novos métodos analíticos. O grande destaque e versatilidade dos CNTs devem-se as várias características principalmente a elevada área superficial, favorável em processos adsorptivos, e elevada estabilidade química e física.

Mesmo que vários métodos utilizando os CNTs tenham sido desenvolvidos para pré-concentração de analitos inorgânicos, geralmente, para amostras complexas, foram observados o tratamento de amostra “off-line” (digestão ácida em micro-ondas⁴, queima em mufla seguido

por dissolução ácida⁵, entre outras). A etapa de digestão ácida mostrou-se indispensável para a maioria das amostras biológicas (por exemplo: sangue total, o plasma, soro e leite) que normalmente são viscosas e ricas em proteínas que podem causar efeitos de matriz e danificar os equipamentos.

Uma alternativa encontrada para extração de analitos orgânicos em fluidos biológicos, de forma rápida e com menor intervenção dos analistas, foi a aplicação da separação total de proteína por meio de materiais de acesso restrito (RAM)⁶. Os RAMs são adsorventes capazes de reter compostos orgânicos (com baixo peso molecular) de fluidos biológicos, separando-os de macromoléculas, tais como as proteínas. Estes sorventes limitam a acessibilidade nos sítios ativos dentro dos poros somente às moléculas pequenas (barreira física), ao passo que as macromoléculas são excluídas devido à presença de grupos hidrófilos que cobrem a superfície adsorvente (barreira química)⁶. Recentemente, alguns estudos têm sido dedicados à modificação química da superfície dos adsorventes comuns, como a sílica ou polímeros orgânicos, convertendo-os em sorventes que são capazes de excluir macromoléculas. Uma estratégia bem sucedida baseia-se na formação de uma capa de albumina de soro bovino (BSA) em torno de camada de sílica^{7,8,9,10} ou polímeros impressos molecularmente (MIP)¹¹.

Embora haja grandes potencialidades para a utilização dos RAMs para analitos inorgânicos de fluidos biológicos, o seu uso tem sido exclusivamente dedicado às extrações de compostos orgânicos. Consideramos que, se um sorvente capaz de adsorver analitos inorgânicos seja coberto com uma camada de BSA, os analitos podem ser retidos e as proteínas excluídas. Esta possibilidade é extremamente promissora para análises de analitos inorgânicos em fluidos biológicos uma vez que os processos lentos de preparação da amostra, com base na decomposição da matriz, poderiam ser substituídos por uma simples extração de fase sólida com o emprego de RAM em sistema FIA.

Considerando as características comprovadas dos CNTs na pré-concentração de diferentes analitos inorgânicos, propõe-se a modificação da superfície dos CNTs com objetivos de obter novas metodologias para determinação de analitos inorgânicos. Em especial, propomos pela primeira vez a modificação deste sorvente com uma camada externa de BSA resultando em nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs), que são capazes de extrair analitos inorgânicos diretamente de fluidos proteicos, sem nenhum tratamento prévio com capacidade de excluir todas as macromoléculas. Os RACNTs foram sintetizados, caracterizados e utilizados em um sistema de extração em fase sólida “on-line” de íons Cd^{2+} em amostras de soro humano, sem qualquer pré-tratamento. As análises foram realizadas utilizando o sistema

de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção por espectrometria de absorção atômica com nebulização térmica em tubo metálico aquecido na chama (TS-FF-AAS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão apresenta uma síntese sobre o preparo de amostras para determinação de cádmio em amostras biológicas com determinação por espectrometria de absorção atômica, aplicação dos CNTs na pré-concentração de analitos inorgânicos e a aplicação dos materiais de acesso restrito para extração direta compostos orgânicos de amostras biológicas.

2.1 ANALITOS INORGÂNICOS ENCONTRADOS EM NÍVEIS TRAÇOS

Alguns elementos presentes na natureza possuem papel metabólico na vida de organismos. De acordo com suas concentrações, os elementos químicos podem ser classificados em macroelementos, microelementos, ou elementos traço, e representam respectivamente 93%, 5% e 1% da massa corporal.

Os elementos que estão presentes em amostras biológicas, de alimentos ou ambiental, nas concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g g}^{-1}$ são considerados elementos traço e quando encontrados em sub-frações destas concentrações são considerados ultra-traços¹².

Considerando a função biológica, os elementos traço e ultra-traços podem ser subdivididos em elementos com função biológica não conhecida (B, Al, Ga, In, Tl, Ge, Be, Rb, Cs, Te, Po, Br, entre outros), elementos tóxicos (Cr, Cd, Hg, Pb, As), elementos essenciais (V, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Se, F, I) e elementos ministrados como medicamento no tratamento de algumas doenças (Li, Y, Pt, Ag, Au, Sb, Bi)¹³.

O cádmio é um metal conhecido como extremamente tóxico e se acumula principalmente no rim¹⁴. Ele possui ocorrência na crosta terrestre de $0,16\text{mg kg}^{-1}$. As fontes de contaminação por cádmio são muitas. Este elemento é encontrado em alimentos, água, ar, entre outras e, a maior exposição humana ocorre no tabaco, na ingestão de alimentos contaminados por fertilizantes, esgoto, lama, adubos e deposição atmosférica¹⁵. Altas doses de cádmio podem produzir efeitos danosos à saúde causando problemas no sistema respiratório e pode estar associado a doenças ósseas. Mais recentemente, alguns autores relatam um possível efeito carcinogênico do cádmio em humanos e sua ação no corpo ocorre devido à combinação com grupos tiólicos (SH) de enzimas e proteínas, o que provoca desarranjos no metabolismo¹⁶. A

avaliação da exposição ambiental e ocupacional ao cádmio é realizada principalmente em amostras de sangue total, plasma, soro e urina^{17,18}. No sangue o cádmio se liga as células vermelhas e por isso os níveis no plasma e no soro são mais baixos. Os níveis de cádmio encontrados em soro de indivíduos não expostos varia entre 0,6-0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^{19,20,21,22,23}. Para HUDNIK e colaboradores²⁴ a concentração de Cd^{2+} em soro humano pode variar de 0,4 a 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A determinação de cádmio exige que os métodos apresentem detectabilidade adequada e que sejam sensíveis e seletivas já que este analito é encontrado em níveis de traço e ultra-traços em amostras ambientais, biológicas, de alimentos, entre outras¹³. Segundo Ferreira e colaboradores¹⁶, as técnicas mais utilizadas para quantificação de cádmio são as espectroscópicas como: Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS); Espectrometria de Absorção Atômica com Aquecimento Eletrotérmico (ETAAS); Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES); Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). Eventualmente são utilizadas as técnicas de TS-FF-AAS e Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HG-AAS) e Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Hidretos (HG-AFS). Destes métodos, a AAS, HG-AAS e TS-FF-AAS são consideradas simples de fácil operação e baixo custo operacional¹⁶. No entanto estas técnicas não apresentam limites de detecção adequados. Ademais, em algumas amostras a matriz apresenta efeitos de interferência para as técnicas mais sensíveis como FGAAS, ICP-OES, etc. Assim, uma alternativa que tem sido explorada nos últimos anos é a introdução de etapas de separação/pré-concentração dos analitos. Apesar desta alternativa, muitas amostras ainda demandam etapas prévias de tratamento de amostra que são morosas, consomem grandes quantidades de reagentes e geram quantidades consideráveis de resíduos. Deste modo, a busca por metodologias que minimizem as etapas de preparo de amostra para algumas matrizes, como leite e fluidos biológicos, podem contribuir para o aumento da velocidade analítica e contribuir para minimização de impactos ao meio ambiente⁵.

2.2 REAGENTES SÓLIDOS NA SEPARAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ANALITOS INORGÂNICOS

A extração em fase sólida (SPE) envolve a distribuição de analitos selecionados entre um gás, líquido ou fase líquida e uma fase sólida²⁵. As principais finalidades da SPE envolvem o enriquecimento de traços e ultra-traços (pré-concentração), remoção da matriz (extração) e troca de meio (transferência da matriz da amostra a uma fase diferente solvente ou gás)²⁶. Uma extração em fase sólida (em batelada ou em fluxo contínuo) consiste de três a quatro etapas sucessivas, tais como o condicionamento do reagente sólido com uma percolação com solvente adequado através do reagente sólido, lavagem do reagente sólido com um solvente de eluição para eliminar os componentes da matriz que foram retidos no reagente sólido (sem deslocar os analitos) e, finalmente, eluindo os analitos de interesse empregando um solvente apropriado. A distribuição do analito entre uma solução aquosa e o solvente é baseada em mecanismos, tais como adsorção, troca iônica, complexação dos íons para formação de par iônico ou de complexos e outras reações químicas na superfície ou no interior dos reagentes sólidos^{27,28}.

A pré-concentração é um processo que proporciona o aumento da razão analito/matriz. Além disso, proporciona uma diminuição no limite de detecção analítico, aumenta a sensibilidade em várias ordens de magnitude, aumenta o grau de precisão dos resultados e pode promover melhoria de seletividade. Em resumo, o processo de enriquecimento²⁹ consiste em separar o elemento de interesse dos constituintes majoritários de uma matriz ou somente separar os interferentes mais significativos²⁸, e concentrar o analito ou isolá-lo em um volume menor que o inicial, onde observa um aumento do sinal analítico³⁰.

As técnicas mais comuns usadas para separação e/ou pré-concentração de traços de analitos inorgânicos incluem a extração em fase sólida, coprecipitação, extração líquido-líquido, filtração por membranas e extração por ponto nuvem^{31,32,33,34}. Recentemente, a técnica de extração com reagentes sólidos tem se destacado devido as suas vantagens de alto fator de enriquecimento, alta recuperação, simplicidade, elevada frequência analítica, e a capacidade de combinação de diferentes técnicas de detecção “on-line” ou “off-line”³. Dos dois modos de SPE, “on-line” e “off-line”, SPE em fluxo apresenta várias vantagens, sobre as técnicas “off-line”, como: maior precisão; baixo consumo de amostras e reagentes; reutilização; menor geração de resíduos; entre outros.

No estudo com extração em fase sólida, o uso adequado do reagente sólido é o fator crítico para obter um alto e eficiente fator de enriquecimento³⁵. Estes reagentes sólidos podem ser

divididos em duas modalidades principais: reagentes sólidos que são capazes de adsorver íons metálicos e reagentes sólidos capazes de adsorver complexos de íons metálicos ou como suporte na incorporação de agentes quelantes. Tais materiais podem ser de origem natural³⁶ (ácidos húmicos, vermicompostos, casca de arroz, *saccharomyces cerevisiae*, bactéria *E. coli*, etc) ou de origem sintética^{37,38,39} (resinas trocadoras de íons, carvão ativado, sílica modificada, resinas absorventes tipo Amberlite IRA-904, espuma de poliuretano, polímeros impressos para íons e mais recentemente as nanopartículas). Os reagentes sólidos mais comuns utilizados são os de origem sintética devido a características como, maior estabilidade química e mecânica. As resinas quelantes são especialmente interessantes devido à sua maior seletividade quando comparado com uma única matriz polimérica.

Um adsorvente que vem se destacando nos últimos anos na separação/pré-concentração de analitos inorgânicos e orgânicos⁴⁰ são os nanotubos de carbono. Observa-se que sua aplicação tem continuado ao longo dos últimos anos com tendência para aplicação em amostras mais complexas⁴¹.

2.2.1 Nanotubos de carbono na separação/pré-concentração de analitos inorgânicos

A nanotecnologia configura atualmente uma das mais importantes tendências na ciência, sendo considerada fundamental para o desenvolvimento de novas tecnologias no presente século. Suas aplicações incluem campos de biotecnologia e farmácia, bem como eletrônicos, ferramentas científicas, processos de fabricação industriais, a introdução de materiais avançados, etc. Neste último aspecto, a nanotecnologia inclui a produção de novos e revolucionários materiais com tamanho de 100 nm ou ainda menores. Os CNTs (de paredes múltiplas) são parte desses novos materiais⁴⁰ e foram produzidos pela primeira vez por Sumio Iijima⁴² em 1991 e os CNTs com parede simples em 1993⁴³. Em ambos os trabalhos de IJIMA, os dados de microscopia eletrônica revelaram que os CNTs possuíam forma cilíndrica (sendo folhas de grafite enroladas como se fosse um canudo), podendo apresentar uma ou várias camadas e apresentavam diâmetro de 4 a 30 nm e 1 µm ou mais de comprimento.

Os CNTs exibem propriedades físicas e químicas únicas potencialmente úteis em muitas aplicações como eletrônica, ótica, química, e outros campos da ciência dos materiais. Dentre as propriedades dos CNTs, citam-se a elevada estabilidade química e física e, principalmente, a elevada área superficial, condição importante em processos adsorptivos⁴⁴.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos métodos analíticos (“off-line” e “on-line”), desenvolvidos até o momento, usando CNTs como reagentes sólidos para separação e/ou pré-concentração de analitos inorgânicos. Nota-se que, as características dos CNTs utilizados foram diversas incluindo a modificação ou não da superfície desses materiais para obtenção de maior seletividade e capacidade adsortiva.

A mudança na seletividade pode ser alcançada pela funcionalização dos CNTs que podem ocorrer por dois tipos, por interações não covalentes, a qual envolve somente adsorção física e sem ligação química, e interações covalentes⁴⁵. Para analitos inorgânicos a modificação mais comum ocorre principalmente pelo uso de agentes oxidantes como HNO₃, H₂O₂, NaOCl, KMnO₄ dentre outros, que interagem com a estrutura dos nanotubos de carbono promovendo abertura, fratura e defeitos. Assim, o processo de oxidação promove a dispersão dos nanotubos de carbono promove sua funcionalização com -COOH, -OH e C=O, que permitem a formação de sítios de ligação capazes de reter íons metálicos⁴⁶. Segundo Li e colaboradores⁴⁷, estes grupos funcionais causam um aumento de carga negativa na superfície dos CNTs, e, como consequência aumentam a capacidade de troca iônica entre a superfície e os íons metálicos acarretando em uma melhora na adsorção. A modificação de superfície também pode ocorrer através de reações de halogenação, hidrogenação, adição de radicais, adição nucleofílica e cicloadição⁴⁸.

Os CNTs podem ser imobilizados covalentemente em suportes sólidos, tais como, aço ou sílica e, assim, as alterações na geometria do dispositivo de extração em fase sólida pode ter espaço⁴⁸. Por outro lado, funcionalizações não-covalentes na parede lateral dos CNTs também podem fornecer uma mudança na seletividade. Este tipo de funcionalização inclui interações iônicas, ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, ligações coordenadas e interações hidrofóbicas. A combinação de duas ou mais interações semelhantes ou diferentes aumentam a estabilidade e a seletividade dos CNTs⁴⁹.

Embora algumas aplicações dos CNTs como reagentes sólidos para analitos inorgânicos em análise por injeção em fluxo tenham sido publicados nos últimos anos, esses materiais ainda apresentam-se promissores no desenvolvimento de metodologias analíticas. No tocante, pode-se verificar que, a aplicação dos CNTs como extratores sólidos para aplicação em amostras mais complexas e com minimização de etapas prévias de tratamento de amostra ainda não foram apresentadas na literatura. Assim, a modificação de superfície dos CNTs pode proporcionar adsorventes promissores no desenvolvimento de novos métodos analíticos com baixos valores de limite de detecção, mais sensíveis e seletivos e que necessitam de diminutas etapas prévias de preparo de amostra.

2.2.2 *Materiais de acesso restrito*

Os procedimentos de preparo de amostras são fundamentais em uma determinação analítica. Além da morosidade, a preparação da amostra é etapa da determinação analítica onde ocorrem os principais erros. Na determinação de analitos inorgânicos, os procedimentos severos de mineralização são ainda mais complexos devido a necessidade de uso de ácidos concentrados em sistemas de aquecimento fechados ou abertos e podem ainda proporcionar riscos aos analistas.

Diante de tais dificuldades, é conhecido que os procedimentos necessários para o preparo das amostras devem ser rápidos e convenientes, minimizando perdas do analito, custos de análise e riscos aos analistas⁵⁰. Para obter tais características, técnicas de introdução direta de amostras têm sido exploradas. Além disso, as técnicas de introdução direta de amostras diminuem erros humanos de manipulação, evitam o manuseio de amostras tóxicas, infecciosas e aumentam a frequência de análise⁵¹. Na análise de analitos inorgânicos, a introdução direta ocorre principalmente por meio de amostragem de líquidos e sólidos em GFAAS^{52,53} espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, do inglês: *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*)⁵⁴.

Para a análise de analitos orgânicos, recentemente as técnicas de injeção direta com uso de fases estacionárias do tipo RAM tem se destacado. Estes materiais combinam os princípios da cromatografia de exclusão e da cromatografia de fase reversa. A sua superfície hidrofílica impede a adsorção de macromoléculas da matriz biológica na fase estacionária e suas propriedades hidrofóbicas (nos poros) são responsáveis pela retenção das moléculas⁵⁵. Uma das vantagens dos RAM é que eles podem ser usados para determinar compostos orgânicos em amostras bastante complexas como plasma e soro humano, sem as etapas prévias de preparo de amostras para remoção de proteínas⁵⁶.

Com o uso de colunas preenchidas com RAM, as amostras são injetadas diretamente na coluna e as macromoléculas são eluídas com a fase móvel de limpeza, evitando a adsorção de proteínas⁵⁷, enquanto que os analitos são retidos⁵⁷ por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas nos sítios ativos no interior dos poros do material.

A exclusão de macromoléculas no RAM pode ocorrer por meio de barreira física ou química. As barreiras físicas consistem na formação de poros onde as macromoléculas não conseguem ultrapassar. No caso da barreira química, grupos funcionais hidrofílicos são ligados covalentemente à superfície da fase estacionária e se portam como uma barreira que impede a

ligação de macromoléculas por meio de repulsão eletrostática. Os RAMs possuem uma grande vantagem por apresentarem alta resistência física com um bom desempenho em termos de capacidade de retenção, eficiência e reprodutibilidade. Além disso, somente os analitos ficam retidos na coluna, possibilitando uma quantificação exata e precisa⁵⁸.

O RAM foi apresentado por Hagestam e Pinkerton em 1985, com a publicação do primeiro artigo relatando a aplicação destes materiais. Desde então o número de trabalhos publicados sobre RAM e a quantidade de tipos desses materiais cresceu exponencialmente. Existem cinco tipos básicos de RAM dividido por grupo de acordo com a natureza da barreira e a estrutura da superfície do sorvente: material misto, material de superfície interna de fase reversa, materiais de fases hidrofóbicas protegidas, materiais de superfícies semipermeáveis e os materiais poliméricos⁵⁹.

No material misto, ambas as superfícies (externa e interna) apresentam propriedades idênticas, que são fornecidas pela ligação covalente de dois grupos funcionais diferentes ou por um grupo funcional com duas possíveis interações. Já os materiais de superfície interna de fase reversa apresentam dois tipos de superfícies onde os grupos funcionais se ligam, resultando na fase hidrofílica que cobre a superfície externa do sorvente e a fase hidrofóbica ligada à superfície interna. Os RAM de fases hidrofóbicas protegidas possuem fase estacionária com uma barreira química impedindo as macromoléculas de ter acesso aos grupos funcionais dentro dos poros do material. Os RAMs de superfícies semipermeáveis apresentam uma barreira química típica de polímero hidrofílico excluindo o acesso das macromoléculas à superfície. Neste caso, a superfície externa repele as moléculas grandes, enquanto que a superfície interna retém os analitos que penetram pelo polímero poroso⁵⁹.

Para uma ilustração das potencialidades dos materiais de acesso restrito na extração de analitos diretamente de amostras biológicas, foi realizada uma revisão das aplicações publicadas até o momento que está apresentada na Tabela 2. É possível notar na revisão, que o emprego de RAMs para determinação de analitos inorgânicos ainda não foi explorado.

Considerando que os CNTs apresentam várias vantagens na extração de analitos inorgânicos e que suas características são favoráveis para a síntese de RAMs, há um grande potencial para análise direta de analitos inorgânicos em matrizes proteicas, diminuindo o número de etapas de preparo de amostras, minimizando a geração de resíduos e consumo de reagentes e conseqüentemente, aumentando a frequência de análise.

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores⁴⁰, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores⁴¹ e pelos autores do trabalho.

(continua)					
Analito	Matriz	Tipo de CNTs	Metodologia	LODs	Referência
Sc	Água de drenagem ácida de mina	MWCNTs	ICP-OES	4 ng L ⁻¹	60
Ag(I)	Água de rio, torneira, poço, neve e água de nascente de rio	MWCNTs	FAAS	0,35 µg L ⁻¹	61
As(III), As (V), Sb (III), Sb (V)	Água mineral, da torneira, de rio, fonte e água do mar	MWCNTs	ETAAS	0,02–0,05 µg L ⁻¹	62
As(III), As (V), Sb (III) e Sb (V)	CRM (água natural), mar, rio, lago e águas subterrâneas	SWCNTs	HG-DC-AFS	2,1–4,3 ng L ⁻¹	63
As(V)	Água de rio e de torneira	MWCNTs	HG-AFS	2 ng L ⁻¹	64
Au (III)	CRM(solo), água de torneira em solo agrícola	MWCNTs	FAAS	0,3 µg L ⁻¹	65
Au (III)	Água de torneira, rio, fonte e residuais	MWCNTs	FAAS	0,15 µg L ⁻¹	66
Au (III), Mn (II)	Água de torneira, fonte e residuais	MWCNTs	FAAS	0,01–0,03 µg L ⁻¹	67
Au(III)	Água de mar e lago	MWCNTs	FAAS	0,15 µg L ⁻¹	68
Au(III) e Mn(II)	Água de torneira, fonte e residual	MWCNTs	FAAS	0,01–0,03 µg L ⁻¹	69
Bi (III)	Água de rio, torneira e amostras de medicamentos	MWCNTs	FAAS	2,3 ngL ⁻¹	70
BrO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	Matriz orgânica sintética	MWCNTs	HPLC	1,54–10,02 µg L ⁻¹	71
Cd (II)	Água de fonte, rio e torneira	MWCNTs	FAAS	0,22 µg L ⁻¹	72
Cd (II)	Urina	MWCNTs	ETA-AAS	0,010 µg L ⁻¹	73
Cd (II)	CRMs (lamas municipal e sedimentos de lagos)	MWCNTs	ICP-OES	1,03 µg L ⁻¹	74
Cd (II), Co (II), Cu (II), Cr (VI), Pb (II), V (V), As (III)	CRM (concha), peixe, camarão e concha	MWCNTs	ICP-MS	0,4 - 3,4 ng L ⁻¹	75
Cd (II), Pb (II)	CRM (cabelo humano), água de rio e de reservatório	MWCNTs	ETAAS	0,15 - 0,44 µg L ⁻¹	76
Cd (II), Pb (II)	Peixes, sedimentos	MWCNTs	FAAS	0,3 - 1 µg L ⁻¹	77
Cd (II), Pb (II), Ni (II)	CRMs (folhas de chá), água de rio e de poço	WCNTs	FAAS	0,04 - 0,32 µg L ⁻¹	78
Cd(II)	Solo, solo de terra poluída, cabelo humano, chá e arroz	MWCNTs	FAAS	0,28 µg L ⁻¹	79

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores⁴⁰, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores⁴¹ e pelos autores do trabalho.

Analito	Matriz	Tipo de CNTs	Metodologia	LODs	Referência
Cd(II)	Água Mineral, de torneira e de rio, amostras de cigarro, CRM de materiais biológicos	MWCNTs	FAAS	11,4 ng L ⁻¹	80
Cd(II)	Neve e águas residuais industriais	MWCNTs	FAAS	0,15 µg L ⁻¹	81
Cd(II), Co(II), Ni(II), Pb(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II)	CRMs (líquen, fígado bovino, sedimento de rio), produtos farmacêuticos e água	MWCNTs	FAAS	1,0 – 5,2 µg L ⁻¹	82
Cd(II), Mn(II) e Ni(II)	Água de Lago	MWCNTs:	ICP-OES	21–48 ng L ⁻¹	83
Cd(II), Pb(II), Cu (II), Zn(II) e MnO ₄ ⁻	Água de torneira, de reservatório e água corrente.	MWCNTs	FAAS	8,7–378 µg L ⁻¹	84
Cd(II), Cr(III), Pb(II), Zn(II), Cu(II) e Mn(II)	Água corrente, de reservatório e de torneira	MWCNTs	FAAS	9–378 ng L ⁻¹	85
Co (II)	Água natural	MWCNTs	FAAS	50 ng L ⁻¹	86
Co (II), Cu (II), Ni (II), Pb(II), e (III), Mn (II)	CRM (sedimento de rio)	DWCNT	FAAS	0,5–6,9 µg L ⁻¹	87
Co (II), Cu (II), Pb (II)	CRM (mexilhão), água natural	SWCNTs	ICP-MS	1,2–39 ng L ⁻¹	88
Co(II)	Água de torneira e de rio	MWCNTs	FAAS	0,55 µg L ⁻¹	89
Co(II), Cd(II), Pb(II), e Pd(II)	Água e solo	MWCNTs	FAAS	0,12 - 0,19 µg L ⁻¹	90
Co(II), Cd(II), Pb(II), Mn(II), Cr(III) e Ni (II).	Folhas de tomate, fígado bovino, trigo cozido, chá preto, líquen e água de fonte e de torneira	MWCNTs	FAAS	0,24–2,60 µg L ⁻¹	49
Cr (III), Fe (III), Pb (II)	CRM (sedimentos de rio), folhas de pêra de bálsamo, rio de água	MWCNTs	ICP-OES	0,19–0,33 µg L ⁻¹	91
Cr (VI)	RM (solo), solos de floresta, agrícolas e ornamentais	MWCNTs	UV	8,5 µg kg ⁻¹	92
Cr(III) e Cr(VI)	Água de rio e residual	MWCNTs	FAAS	0,90 µg L ⁻¹	93
Cu (II), Fe (III), Mn (II), Pb (II)	CRM (sedimentos de rio, água de lago), água de torneira e mineral.	MWCNTs	FAAS	3,5 - 8,0 µg L ⁻¹	94

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores⁴⁰, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores⁴¹ e pelos autores do trabalho.

Analito	Matriz	Tipo de CNTs	Metodologia	LODs	Referência
Cu (II), Ni (II)	CRMs (solos, folhas de chá, o cabelo humano, chá)	MWCNTs	FAAS	0,31- 0,63 $\mu\text{g L}^{-1}$	95
Cu (II), Ni (II), Zn (II)	Água de torneira, fonte e águas residuais de galvanoplastia	MWCNTs	FAAS	40 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$	96
Cu (II), Fe (III), Pb (II)	Água de rio	MWCNTs	ICP-OES	0,15 - 0,26 $\mu\text{g L}^{-1}$	97
Cu (II), Co (II), Ni(II) e Pb(II)	Sedimentos de rio, água de torneira, fonte, ar e mineral	MWCNTs	FAAS	1,64 – 5,68 $\mu\text{g L}^{-1}$	98
Cu(II)	Água de lago e torneira	MWCNTs	FAAS	0,42 $\mu\text{g L}^{-1}$	99
Cu(II)	Água de neve de chão, e rio	MWCNTs	FAAS	0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$	100
Cu(II)	Água de lago	MWCNTs	FAAS	2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	101
Cu(II)	Água de torneira e mineral	MWCNTs	FAAS	1,46 $\mu\text{g L}^{-1}$	102
Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Ni (II) e Co(II)	Água de torneira, fonte, água do mar, molho de tomate, conservas de peixe, folhas de maçã e grão de bico	MWCNTs	FAAS	0,30 - 0,60 $\mu\text{g L}^{-1}$	103
Eu, Gd, Ho, La, Sm, Tb e Yb	Água de Lago e água do mar sintética	MWCNTs	ICP-OES	3 - 57 ng L^{-1}	104
F ⁻ , Br ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , F ⁻ , Br ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻	Matriz orgânica sintética	MWCNTs	HPLC	0,41 - 3,17 $\mu\text{g L}^{-1}$	105
Ga (III)	Cinzas	MWCNTs	FAAS	3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	106
H ₂ AsO ₄ ⁻	Água de rio e torneira	MWCNTs	AFS	2 ng L^{-1}	107
Hg (II)	CRM (folhas de tabaco), água de torneira, de reservatório, rocha fosfática	MWCNTs	FAAS	0,0123 $\mu\text{g L}^{-1}$	108
Hg(II)	Água de rio, torneira e lago	MWCNTs	CV-AFS	1,2 ng L^{-1}	109
Ni (II), Pb (II)	CRMs (lama municipal, sedimentos de lagos)	MWCNTs	ETAAS	10 - 30 ng L^{-1}	110
Pb (II)	CRMs (sedimentos de rio), água de rio, torneira e lago	MWCNTs	ICP-OES	0,27 $\mu\text{g L}^{-1}$	111
Pb (II)	Água de rio	MWCNTs	ICP-OES	0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$	112
Pb(II)	Água de torneira, mineral, mar, soro, alho, e ginkgo Biloba	MWCNTs	FAAS	2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	113

(continuação)

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores⁴⁰, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores⁴¹ e pelos autores do trabalho.

Analito	Matriz	Tipo de CNTs	Metodologia	LODs	Referência (conclusão)
Pb (II)	Água de rio	MWCNTs	AAS	0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$	114
Pb(II)	Água	MWCNTs	FAAS	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	115
Pb(II) e Mn(II)	Água, urina e arroz	MWCNTs	FAAS	1,0/0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	116
Pd (II)	CRM, água, cinzas, poeira de estrada	MWCNTs	FAAS	0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	117
Pd (II)	CRM (liga de platina-irídio), águas residuais, poeira de estrada	MWCNTs	FAAS	0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	118
Rh (III)	Água de torneira, poço, rio, mar, águas residuais e liga de platina- irídio	MWCNTs	FAAS	0,010 $\mu\text{g L}^{-1}$	119
Tl (III)	Água de torneira	MWCNTs	STPF-ETAAS	150 ng L^{-1}	120
Trimetilchumbo (I), dimetilchumbo (II), trietilchumbo (I), dietilchumbo(II), metil-mercúrio (I), etilmercúrio (I), Hg (II), n-butil estanho(III), n-dibutil estanho (II), tri-n-butil estanho (I) e estanho (IV)	Água e sedimento costeiro	MWCNTs	GC-MS	1-3 ng L^{-1}	121
V(IV) e V(V)	Água de torneira e de lagoa	MWCNTs	ETAAS	19 ng L^{-1}	122
Zn (II)	CRMs (Pepperbush, cabelo humano, folhas de chá, chlorella, mexilhões, sedimentos de lagoa), bem, água potável e residual.	MWCNTs	FAAS	0,07 ng L^{-1}	123

Fonte: Do Autor

Tabela 2 - Resumo de algumas aplicações de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas.

(continua)

Aplicação	Matriz	Analitos	Material	Referências
Análise de drogas e substâncias biologicamente ativas em fluidos biológicos	Sangue humano	Benzodiazepinas e metabolitos	LiChrospher RP-18 ADS (25x 4mm), particle size 25µm, Merck,	124
	Plasma humano	Acetato de ciproterona	LiChrospher 60 XDS (25x 4mm), 25 µm, Merck	125
	Urina humana	Verapamil e metabolitos	LiChrospher RP-4 ADS (25x2mm), 25µm, Merck	126
	Plasma humano	Sotalol	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25 µm, Merck	127
	Plasma humano	Meloxicam	LiChrospher 60 XDS (25x4mm), 25 µm, Merck	128
	Plasma humano	Cloxacilina	LiChrospher RP-18 ADS (25x 4mm), 25µm, Merck	129
	Soro humano	Furosemida	LiChrospher 60 XDS (DEAE/diol) (25x4 mm), 25µm, Merck	130
	Plasma humano	Rofecoxib	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	131
	Soro humano	Voriconazol	LiChrospher 60 RP-18 ADS (25x4 mm), 40–63µm, Merck	132
	Plasma humano	Cafeína e matabolitos	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	133
Plasma humano	Cocaína e benzoilecgonina	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	134	
Determinação de antídotos	Plasma humano	Atropina	LiChrospher 60 XDS (SO ₃ /diol) (25x4 mm), 25µm, Merck	135
Análise veterinária	Plasma de cavalo	Enantiômeros de cetoprofeno	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	136
Identificação de peptídeos de humano com peso molecular de até 20 kDa	Sangue humano	Angiotensina 1	LiChrospher 60 XDS (SO ₃ /diol) (25x4 mm), 25µm, Merck	137
	Sangue humano	Angiotensina 2	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25m, Merck	138
	Sangue humano	Peptídeos	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck, 60 XDS (25x4mm), 25µm, Merck	
	Plasma humano	Proteínas enzimáticas	SCX-RAM (SO ₃ /diol) (25x2mm) e (25x 4 mm), 25µm	139
	Urina humana	Drogas	(LSP MDA, Merck)	

Tabela 2 - Resumo de algumas aplicações de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas.

(conclusão)

Aplicação	Matriz	Analitos	Material	Referências
Desenvolvimento de novas drogas	Soro de ovelha Plasma de ovelha	Metaloproteínas	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	140
Purificação de plasmídeo de DNA	Célula lisa	Gene	Q-Sepharose S-500 HR, –	141
Monitoramento ambiental	Urina humana	1,2 – naftol	LiChrospher RP-8 ADS (25x 4mm), 25µm, Merck	142
	Plasma humano	Triésteres organofosforados	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	143
	Urina humana	Cinco principais metabolitos da di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP)	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	144
	Água potável, de superfície de rio e sedimentos	Hormônios sexuais esteróides	LiChrospher RP-4, RP-8 or RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	145
Análise de alimentos	Frutas	Pesticidas	Hisep SHP (50 · 4.6 mm), 5µm, Supelco SPS-5PM-S5-	146
	Água do solo	Herbicidas	100-C18 (50 x4.6 mm), 5µm, Regis Tech	
	Suco de maçã	Patulina	-----	147
	Gema de ovo	Colesterol	BioTrap C18, protein-coated RP- 18 pre-column, ChromTech	148
	Leite	Poliaminas	LiChrosorb C18 (50x4.6 mm), 10µm, Agilent	149

Fonte: Do Autor

2.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO EM SISTEMAS DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM REAGENTE SÓLIDO

O desenvolvimento tecnológico e industrial desde seu início tem proporcionado o aumento na produção de alimentos, bens de consumo, instrumentação médica, sistemas de comunicação, transporte, segurança e diversos outros itens que são fundamentais para o aumento da expectativa de vida da população mundial. Do mesmo modo, devido ao desenvolvimento industrial e populacional desordenado, houve também uma “explosão” nas formas de geração de impactos ambientais que atualmente é um fator preocupante na qualidade de vida da população. Nesse sentido, o controle da qualidade de produtos industriais bem como o controle da poluição ambiental gera a cada dia um número crescente de amostras laboratoriais que demandam métodos analíticos mais eficientes, seletivos e sensíveis.

A automatização das técnicas analíticas surgiu com o objetivo de aumentar o desempenho analítico, diminuir o trabalho técnico e diminuir custos. Os métodos automatizados se dividem em: batelada e em fluxo. A análise química por injeção em fluxo (FIA) foi proposto por Ruzicka¹⁵⁰, em 1975, e apresenta diversas vantagens em relação aos procedimentos em batelada. Dentre essas vantagens podemos citar: menor envolvimento do analista, aumento na precisão e exatidão, diminuição da frequência analítica, exploração de aspectos cinéticos e gradientes de concentração, menor consumo de reagentes, menor geração de resíduos e substituição de reagentes tóxicos. Essas três últimas vantagens também são conceitos relevantes na Química Analítica Verde⁵.

Segundo Fang,¹⁵¹ a análise por injeção em fluxo fundamenta-se na combinação dos princípios de injeção da amostra, dispersão controlada e tempo reprodutível de todo o processo. O sistema FIA pode apresentar diversas configurações (linha única, confluência, zonas coalescentes, fluxo intermitente, injeção sequencial, multicomutação, entre outros) que devem apresentar características compatíveis com a aplicação desejada.

A análise por injeção em fluxo em métodos de extração/pré-concentração baseados na adsorção do analito num reagente sólido são considerados os mais usuais em propostas analíticas visando elevar a sensibilidade das técnicas espectroanalíticas. De forma simplificada, nesses procedimentos uma quantidade do reagente sólido é empacotada em uma coluna que fica disposta no sistema de fluxo, de tal modo, que uma quantidade fixa de amostra irá passar pela coluna por um determinado tempo, percolando o analito. Após esta etapa, o sistema é comutado e um fluido eluente irá percolar a coluna levando o analito ao detector. Dependendo do tipo de

reagente sólido e da técnica de detecção, o sistema FIA poderá receber reagentes em confluência com a amostra e/ou com fluido carregador respectivamente¹⁵².

Os sistemas em fluxo para extração/pré-concentração com uso de reagentes sólidos podem apresentar diversas configurações, incluindo configurações para especiação de traços de analitos inorgânicos com aplicação de duas colunas com reagentes sólidos iguais¹⁵³ ou diferentes¹⁵⁴.

Fang¹⁵⁵ e colaboradores relataram em seu trabalho considerações fundamentais e práticas relevantes ao projeto de sistemas em fluxo para extração/pré-concentração com reagentes sólidos em colunas acoplados a detectores espectrométricos. Segundo esses autores, nesses sistemas, os parâmetros que devem ser considerados no desenvolvimento de métodos são: Fator de Enriquecimento (EF); Eficiência de Concentração (CE); Fator de Transferência; etc.

Teoricamente o EF é a razão entre a concentração da espécie analítica na fase concentrada e a concentração original na amostra. Em termos práticos, o valor do EF é obtido pela razão entre os coeficientes angulares da seção linear das curvas de calibração com e sem pré-concentração. Assim, a EF é dada por:

$$EF = m_a/m_d \quad (1)$$

,onde: m_a e m_d são, respectivamente, os coeficientes angulares da seção linear das curvas de calibração com e sem pré-concentração.

A CE serve para avaliar e comparar a eficiência da pré-concentração dos sistemas em fluxo. Ele é definido pelo produto do EF e a frequência de amostragem (f) definida em termos de números de amostra analisadas por minuto. Portanto temos que CE é dada por¹⁵⁵:

$$CE = EF \times f \text{ (min}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

Nos métodos de pré-concentração em fluxo, o analito não é completamente transferido para o reagente sólido devido ao tempo de equilíbrio não ser suficiente para a transferência completa e devido à ineficiência do meio de coleta (capacidade da coluna e efeitos de matriz)¹⁵⁵.

Em métodos de análise por injeção em fluxo, a inserção da amostra no fluxo transportador proporciona um gradiente de concentração devido ao processo de dispersão. Segundo Ruzicka

e Hansen¹⁵⁰ o coeficiente de dispersão (D) é definido pela razão da concentração do analito no fluido carregador antes e após a dispersão e é dado por:

$$D = C^0 / C \quad (3)$$

onde C^0 é a concentração do analito na solução injetada e C é a concentração do analito na zona de dispersão sob determinadas condições.

Em sistemas FIA, o valor de D é comumente maior que 1,0. No entanto, o valor de D menor que 1,0 pode ser usado para caracterizar os sistemas de pré-concentração, onde a concentração final do analito é maior que a da amostra. Embora alguns autores não considerem D um parâmetro inadequado para sistemas de pré-concentração, sabe-se que a dispersão é um fator importante para a otimização dos sistemas de fluxo em colunas e deve ser considerada em todas as etapas do desenvolvimento de um novo método¹⁵¹.

A dispersão nos sistemas de extração e pré-concentração deve levar em consideração a forma de percolação da amostra na coluna, dimensões da coluna, as propriedades do reagente sólido, as características (pH e concentração) do eluente e amostra, a vazão de percolação da amostra e do eluente, a configuração do sistema de fluxo com a coluna, o percurso do eluente após a etapa de eluição até chegar ao detector, entre outros^{151,155}.

Em termos práticos, para minimizar a dispersão em sistemas de extração/pré-concentração em coluna com aplicação de reagentes sólidos deve-se considerar: Dispersão durante a coleta da amostra; Dispersão durante a eluição; Dispersão durante o transporte do eluente e inserção de reagentes em confluência após a coluna.

O índice de consumo (IC) consiste no volume de amostra necessário para obter uma unidade de fator de enriquecimento e é dado por:

$$IC = V_a / EF, \quad (4)$$

onde V_a é o volume de amostra pré-concentrada.

Nota-se que várias características dos sistemas de análise por injeção em fluxo para extração/pré-concentração com uso de reagentes sólidos já foram estudadas e são relevantes no desenvolvimento de métodos mais sensíveis e rápidos. Porém, as técnicas de extração/pré-concentração com coluna associados à AAS, ainda necessitam de etapas prévias de digestão ácida de fluídos proteicos que é responsável pelo maior consumo de tempo dos métodos

desenvolvidos. Neste contexto, o estudo de diferentes configurações para os sistemas FIA de extração/pré-concentração, incluindo o desenvolvimento de novos reagentes sólidos capazes de permitir a extração dos analitos de interesse diretamente de amostras proteicas poderá permitir o aumento da frequência de amostragem que por consequência poderá reduzir o consumo de reagentes e minimização de resíduos gerados por amostra analisada atentando para conceitos de química analítica verde⁵.

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi a síntese de nanotubos de carbono de acesso restrito capaz de extrair/pré-concentrar Cd^{2+} em amostras de soro humano e o desenvolvimento de uma metodologia analítica para extração/pré-concentração de Cd^{2+} em amostras de soro humano com em um sistema mecanizado com análise por TS-FF-AAS.

3.1 ESPECÍFICOS

- a) Funcionalizar os CNTs e recobri-los com BSA para a obtenção dos nanotubos de acesso restrito, RACNTs.
- b) Avaliar a capacidade do material em excluir proteínas em amostras de soro humano;
- c) Caracterização morfológica dos RACNTs;
- d) Avaliar a capacidade dos RACNTs na extração/pré-concentração “on-line” de Cd^{2+} diretamente em soro humano;
- e) Avaliar diferentes configurações para o sistema de análise por injeção em fluxo de extração/pré-concentração com objetivo de elevar a velocidade analítica e maximizar a resposta analítica;
- f) Otimização das variáveis do sistema de extração/pré-concentração utilizando RACNTs como sorvente para íons Cd^{2+} com objetivo de elevar a velocidade analítica, minimizar consumo de reagentes e amostra e maximizar a resposta analítica;
- g) Aplicar o método proposto na determinação de Cd^{2+} em amostras de soro humano.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Neste item apresentaremos todos os materiais, reagentes utilizados no trabalho, os procedimentos utilizados para síntese dos RACNTs e todas os procedimentos de otimização utilizados no desenvolvimento do trabalho.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS

Na determinação de Cd^{2+} , foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Shimadzu AA-6800 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma lâmpada de cátodo oco de cádmio e uma lâmpada de deutério para correção de fundo. Os sinais foram obtidos pelas medidas de absorbância (área do pico) a 228.8 nm, com corrente da lâmpada de catodo oco fixada em 8 mA. O sistema de spray térmico (TS-FF-AAS) foi operado com fluxo de acetileno e de ar de $3,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $10,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. O sistema é composto de um tubo de níquel (Ni 200 Realum, UNS N 2200, São Paulo, Brasil), de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro interno, com seis furos de 2,5 mm de diâmetro dirigido ao queimador para a penetração da chama no interior do tubo. Perpendicular aos furos, um capilar cerâmico não poroso de Al_2O_3 (Friatec, Mannheim, Alemanha) (comprimento de 10 cm, 0,5 mm DI, e de 2,0 mm de diâmetro externo) foi utilizado para conduzir a amostra ao tubo de níquel. As morfologias dos adsorventes foram estudadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), JEOL LV-JSM 6360 (Tokyo, Japan) e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) (JEOL, JEM 2100). As composições químicas dos RACNTs foram avaliadas por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) X FLASH 6/10 (BRUKER, Venezia, Itália).

O ensaio de exclusão de proteínas foi realizado para avaliação do tempo total necessário para a limpeza da coluna, na etapa extração/pré-concentração, onde o canal do resíduo foi direcionado a uma cubeta de fluxo (de fabricação caseira contendo janelas de quartzo) e foram realizadas leituras a 280 nm em espectrofotômetro UV-VIS (BIOSPECTRO SP-220). O sistema FIA utilizado para extração/pré-concentração de Cd^{2+} utilizou uma bomba peristáltica (Ismatec IPC-08, Glattzbrugg, Suíça), equipada com tubos de Tygon[®] para impulsionar todas as soluções de reagentes e amostras. Para selecionar as etapas de extração/pré-concetração,

lavagem e eluição/amostragem foi utilizado um injetor comutador de fabricação caseira (em acrílico).

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho foram de grau analítico as soluções foram preparadas utilizando água deionizada 18.2ΩWcm obtidas de um equipamento de purificação Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas utilizados apresentam diâmetro de parede exterior de 6 a 9 nm e comprimento de 5 μm (Sigma-Aldrich®; Steinheim, Alemanha). Os reagentes BSA, glutaraldeído, e boroidreto de sódio (todos da Sigma-Aldrich) foram usados para o revestimento dos nanotubos de carbono.

As soluções padrões utilizadas no trabalho foram preparados pela diluição de uma solução estoque de Cd²⁺ (1,000 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha). Também foram utilizados no sistema FIA ácido nítrico e as soluções tampão acetato e fosfato (Sigma-Aldrich).

4.3 PREPARO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO

Os CNTs utilizados foram oxidados com ácido nítrico¹¹³. Na etapa de oxidação uma dispersão de 500 mg de CNTs em 30 mL de ácido nítrico 65%, foi aquecida a 120 °C por 60 min em um sistema de refluxo. Posteriormente, os CNTs foram lavados com água destilada, para remoção do excesso de ácido, e em seguida o material foi seco em estufa a 100 °C.

Para determinação de Cd²⁺, com extração/pré-concentração direta em amostras de soro humano, os CNTs oxidados¹¹³ foram recobertos com BSA conforme descrito por K. Hoshina et al.¹⁵⁶ e H. Sambe et al.¹⁵⁷ seguindo alterações apresentadas por Figueiredo e colaboradores¹⁵⁸. No procedimento, os CNTs oxidados foram empacotados em um cartucho de SPE onde foi percolado 20 mL de albumina de soro bovino (BSA) 1% em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 6,0). Posteriormente, 5 mL de solução de glutaraldeído 1% foi misturado aos CNTs, seguido de repouso por 5 h. Após o escoamento da solução residual o material foi transferido para um béquer de 100 mL onde recebeu 20 mL de solução de boroidreto de sódio 1%. Os RACNTs

foram lavados extensivamente com água para a eliminação dos resíduos da síntese. O material apresentado, considerando as diversas formas de funcionalização dos CNTs, foi depositado no Brasil e no exterior por meio do Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT) com número BR 10 2014 001074-2 (ANEXO).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS E NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO

A presença da camada de BSA nos RACNTs foi investigada por SEM, TEM e EDS. Para a realização das medidas de SEM e EDS, os materiais foram cobertos com uma fina camada de platina. A voltagem de aceleração de elétrons foi de 15,0 kV. Para as medidas de transmissão eletrônica, os CNTs foram dispersos em uma grade de cobre com filme de carbono e foi aplicada uma voltagem de 21,5 kV para aceleração dos elétrons.

O estudo de capacidade de exclusão de proteínas foi realizado para os CNTs e RACNTs. Inicialmente, 25 μL de solução padrão de BSA 44 mg mL^{-1} (aproximadamente a mesma concentração encontrada no soro humano) foi injetada num sistema de HPLC, sem qualquer coluna, com detector de UV a 280 nm e usando água deionizada como fase móvel a 1 mL min^{-1} . A área de sinal representa 100% de BSA (toda a BSA chegou ao detector). Nos outros experimentos, foi acoplado ao sistema de HPLC, colunas contendo 30 mg do material (CNTs ou RACNTs), e foi injetada 25 μL de solução padrão de BSA 44 mg mL^{-1} . As áreas dos picos obtidos foram comparadas com a área do sinal de 100% de BSA (área de pico sem coluna) e a porcentagem obtida corresponde a exclusão das proteínas pelas colunas.

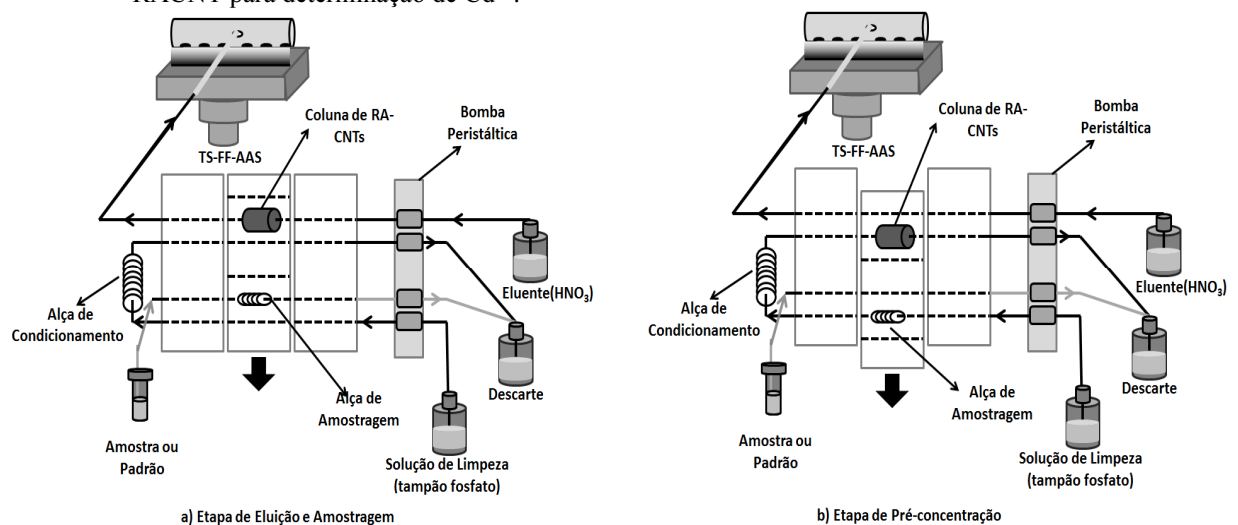
Foram realizados estudos de cinética de adsorção para os CNTs e RACNTs. No ensaio, 10 mg do reagente sólido (CNTs ou RACNTs) foram transferidos para tubos de polipropileno contendo 10 mL de 50 mg L^{-1} de Cd^{2+} (preparado por nitrato de cádmio em pH 7,0) a 25 ° C. Os tubos foram agitados em vortex a 252 g durante 10, 25, 40, 55, 70 e 90 min (ensaio realizado em triplicata) e imediatamente centrifugados a 699 g durante 10 minutos. As concentrações de Cd^{2+} nos sobrenadantes foram analisadas por absorção atômica em chama (FAAS). Para os estudos de adsorção, 10 mg de CNTs ou RACNTs foram adicionados em tubos de polipropileno contendo Cd^{2+} nas concentrações de 5, 20, 50, 80, 120, 200 e 300 mg L^{-1} (ensaio realizado em triplicata). Os tubos foram agitados em vortex a 252 g por 30 min e imediatamente centrifugados a 699g. A concentração de Cd^{2+} nos sobrenadantes foi analisada por FAAS. A

quantidade de Cd^{2+} adsorvido (Q_e) em cada experimento foi calculada a partir da diferença da concentração entre as concentrações iniciais e as concentrações de equilíbrio (C_e).

4.5 SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO COM EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM LINHA

O Sistema de extração/pré-concentração em fluxo com detecção por TS-FF-AAS está apresentado na Figura 1. Na primeira etapa (Figura 1a), a alça de amostra é preenchida (volume total de 2 mL) e, ao mesmo tempo, a solução de HNO_3 0,1 mol L^{-1} elui os analitos extraídos/pré-concentrados em uma etapa anterior conduzindo-os para detecção por TS-FF-AAS a uma vazão de 0,75 mL min^{-1} . Na etapa 2 (Figura 1b), o injetor é comutado e a amostra é conduzida para a coluna contendo os RACNTs usando uma solução de tampão fosfato (0,01 mmol L^{-1} , pH 7,0) a uma vazão de 0,75 mL min^{-1} com um tempo total de 4,5 min. Os íons Cd^{2+} ficam retidos nos RACNTs e as proteínas são totalmente excluídas. Finalmente, o comutador é levado à posição inicial (Figura 1a) e os íons Cd^{2+} são conduzidos para detecção por TS-FF-AAS. Uma alça de condicionamento foi usada para a eliminação de resíduos de HNO_3 da coluna antes da nova etapa de extração/pré-concentração. A alça foi necessária para que não haja a precipitação de proteínas da amostra na coluna de RACNTs devido ao encontro de zonas de amostra (rica em proteína) com solução ácida (resíduo da etapa de eluição).

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de extração/pré-concentração “online” com emprego dos RACNT para determinação de Cd^{2+} .



Fonte: Do Autor

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO SISTEMA FIA

Os fatores químicos e de fluxo envolvidos no sistema de extração/pré-concentração, incluindo: pH da amostra (pH_A), concentração do tampão (C_T), concentração do eluente (C_E), vazão de pré-concentração (V_P) foram investigados, para maximizar a resposta analítica, de forma univariada.

4.7 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A manipulação das amostras de sangue humano foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unifal-MG (processo CAAE: 11401412.0.0000.5142). As amostras sanguíneas, 10 mL cada, foram obtidas por punção venosa. Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 1000g. O soro humano foi transferido para outro tubo para análise posterior. Para compor o “pool” de soro humano foram coletadas amostras de vinte e cinco pacientes do Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da Unifal-MG. As amostras de soro humano foram diluídas em tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ e pH 7,0, a uma proporção de 3:7 v/v (soro:tampão) e injetadas diretamente no sistema FIA-TS-FF-AAS.

4.8 TRATAMENTO DOS DADOS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método bioanalítico foi realizada considerando as diretrizes básicas preconizadas pela *Food and Drug Administration* (FDA)¹⁵⁹, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁶⁰, *International Conference on Harmonization* (ICH)¹⁶¹, entre outros autores^{162,163}. Os padrões de Cd²⁺ foram preparados em um “pool” de soro humano (n = 25) pela fortificação com Cd²⁺ de 0,8 a 30,0 µg L⁻¹. Os padrões foram preparados em tampão fosfato com concentração final de 0,01 mol L⁻¹ e pH 7,0. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram definidos de acordo com a IUPAC¹⁶⁴, como 3σ/m e 10 σ/m, respectivamente, onde σ é o desvio padrão de 10 leituras do branco e m é a inclinação da curva analítica.

A precisão intra-dia foi avaliada como o desvio padrão relativo (RSD) de cinco leituras independentes de Cd^{2+} no sistema de pré-concentração usando um “pool” branco de soro humano fortificado com Cd^{2+} a 0,80, 15,0 e 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os ensaios de precisão intra-dia foram repetidos por 3 dias nas mesmas concentrações de Cd^{2+} para obtenção da precisão inter-dias. A exatidão do método foi avaliada por testes de adição e recuperação em seis diferentes amostras com concentração de Cd^{2+} a 2,0, 5,0 10,0, 14,0, 20,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Também foram realizados ensaios de comparação para três amostras de soro humano digeridas em chapa aquecida com posterior análise por TS-FF-AAS¹⁶⁵. As amostras, 4 mL de cada, foram digeridas em uma mistura de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (20/4 mL) sob aquecimento em chapa aquecida. Após a digestão as amostras foram aquecidas em chapa até quase secura e foram diluídas para um volume final de 2mL.

Para a avaliação do sistema de pré-concentração “on-line” foram calculados os seguintes parâmetros de fluxo: fator de enriquecimento, frequência de amostragem, índice de consumo e eficiência de concentração.

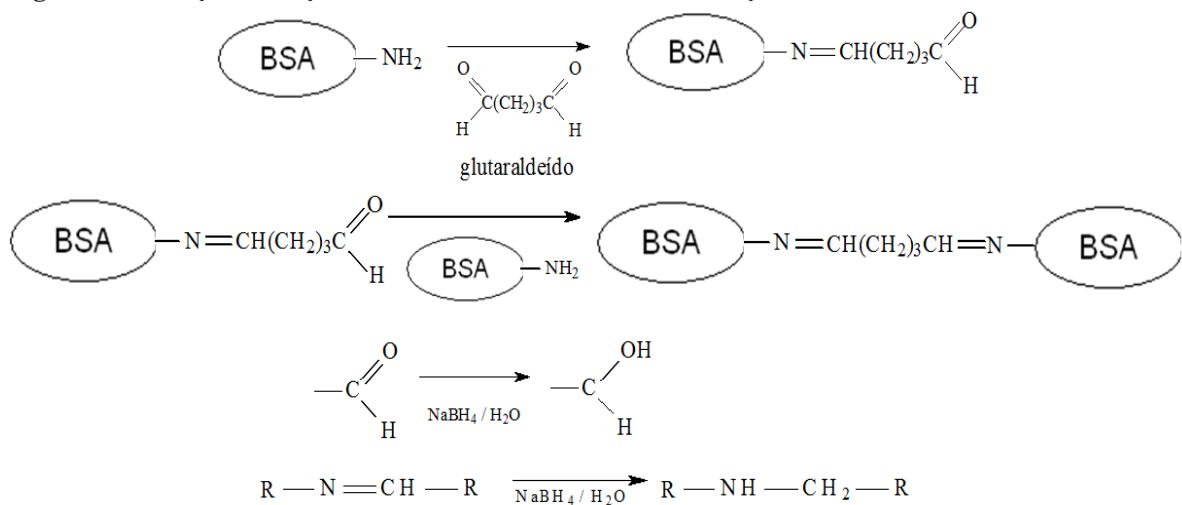
O tratamento dos dados foi realizado a partir do software Origin Pro 8.1[®] e os registros de sinais de absorção atômica foram extraídos das imagens por meio o software GraphData 1.0. (<http://www.sgrillo.net/graphdata/>; software livre)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

A Figura 2 ilustra a reação de formação do recobrimento de BSA nos CNTs. A camada de BSA foi fixada na superfície dos CNTs pelo intercruzamento de grupos amina da BSA usando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada. Os grupamentos imina, resultantes do intercruzamento (função muito reativa), e grupamentos aldeído foram reduzidos a aminas com boroidreto de sódio proporcionando estabilidade para a camada de BSA¹⁶⁶. A presença da camada de BSA foi confirmada pelas micrografias eletrônicas de varredura e micrografias eletrônicas de transmissão, apresentadas na Figura 3a-f.

Figura 2 - Ilustração da reação de intercruzamento da BSA na formação do recobrimento sobre os CNTs¹⁶⁶.

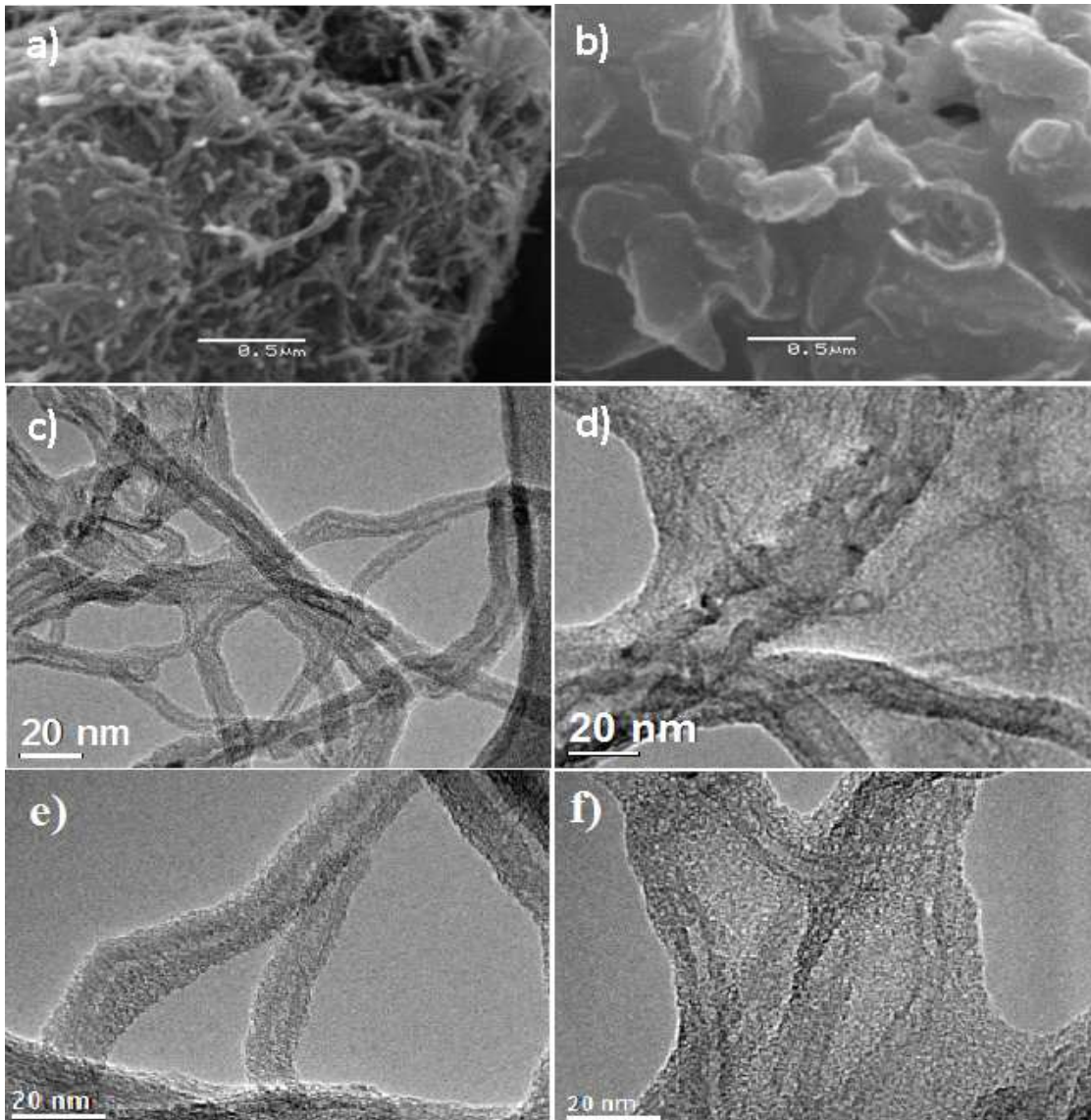


Fonte: MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.

A Figura 3a mostra os CNTs com uma pequena variação de diâmetro que está de acordo com as características dos CNTs comerciais. Na Figura 3b (RACNTs) podemos observar apenas uma massa bruta (os filamentos de CNTs não são visíveis). Estes resultados mostram que há uma diferença entre os materiais com a formação da camada de BSA, no entanto não é possível obter mais detalhes sobre as características morfológicas dos RACNTs.

Para mais informações dos RACNTs, foram obtidas imagens de TEM para as mesmas amostras. As Figura 3(c, e) mostram os CNTs isolados e, mais uma vez, com uma leve variação no diâmetro dos filamentos. Na Figura 3(d, f) podemos observar os CNTs cobertos por uma camada amorfa. Na formação da camada de BSA nos CNTs a reação de intercruzamento das proteínas ocorre de forma desordenada proporcionando a formação de pequenos aglomerados. Observou-se também pelas medidas de TEM, que o material do recobrimento (BSA intercruzada) não se degrada com a focalização do feixe de elétrons. Quando as mesmas medidas são realizadas para a BSA apenas adsorvida nos CNTs o feixe de elétrons provoca a queima da BSA adsorvida. Tal fenômeno mostra a alta resistência obtida pelo material após a reação de intercruzamento. Nota-se também que o material do recobrimento apresenta maior transparência ao feixe de elétrons que é compatível com uma menor incidência de átomos para o recobrimento comparando com os CNTs. As superfícies dos CNTs também foram analisadas por EDS resultando numa porcentagem superior a 99% de carbono como já era esperado. Após o revestimento com BSA (RACNTs), a composição do material em porcentagem foram as seguintes: 73,88% de carbono, 14,46% de nitrogênio, 5,40% de oxigênio e 0,5% de enxofre. Os resultados confirmam a presença da camada de BSA nos CNTs, devido à diminuição na porcentagem de carbono e o aparecimento de nitrogênio, oxigênio e enxofre, geralmente presente na BSA.

Figura 3 - Micrografias eletrônicas de varredura (a e b) e micrografias eletrônicas de transmissão (c - f) dos CNTs (a, c, e) e RaCNTs (b, d, f).

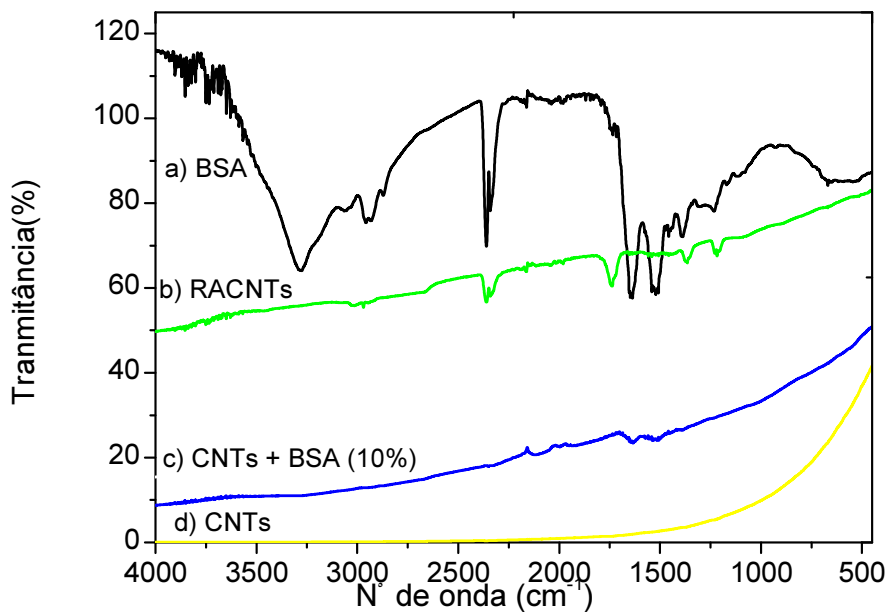


Fonte: Do Autor

Foram realizadas medidas de FTIR pelos modos de refletância atenuada e por medidas de transmitância com a diluição do material com preparo de pastilhas de KBr. Para as medidas usando a pastilha de KBr, notou-se que os RaCNTs não formam uma mistura homogênea com KBr e os resultados não apresentaram as bandas características da BSA nos RaCNTs. Nas medidas de FTIR realizadas por refletância não foi possível verificar os principais grupos funcionais característicos da BSA (Figura 4a) nos RaCNTs (Figura 4b). A única alteração notável refere-se a um aumento da transmitância dos RaCNTs (Figura 4b) comparado aos CNTs (Figura 4d) indicando que após o recobrimento dos CNTs há uma diminuição da absorbância de radiação infravermelha pelo material. Nota-se também que, os valores de transmitância na

região do infravermelho para os CNTs e RACNTs sempre é muito baixa devida a elevada absorção de radiação dos materiais. Devido à dificuldade de visualização das bandas características da BSA nos RACNTs, foram realizadas medidas de FTIR-ATR dos CNTs na presença de albumina pura. Neste estudo, CNTs foram misturados com BSA na proporção de 10%. Nota-se na Figura 4c que houve apenas aumento nos valores de transmitância total não sendo visíveis as bandas da BSA. Deste modo, concluímos que os CNTs apresentam altos valores de absorbância para radiação infravermelha na faixa estudada, causando interferência nas bandas de BSA que recobrem os nanotubos de carbono. Possivelmente a proporção de BSA em relação aos CNTs, nos RACNTs, não é suficiente para detecção por FTIR.

Figura 4 - Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) para: BSA, CNTs (puros e oxidados) e RACNTs.



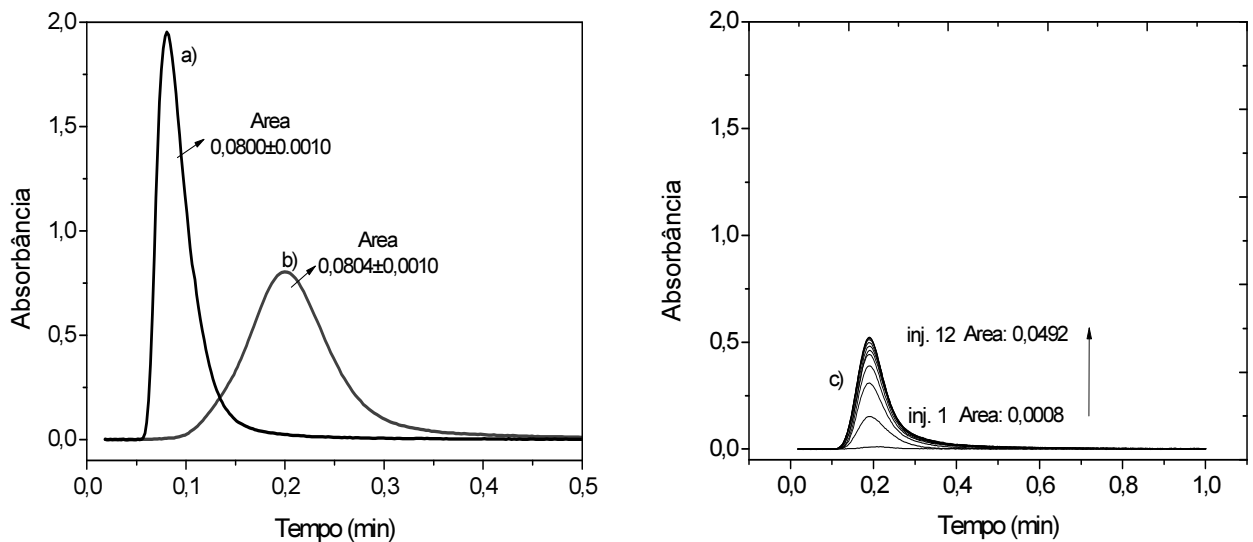
Fonte: Do Autor

A Figura 5(a-c) mostra os resultados do ensaio de exclusão de proteínas. Neste estudo, os valores de área são comparados com o padrão de 100% (Área=0,0800), quando o sistema não possui nenhuma coluna. Nota-se nos resultados da Figura 5c que, na presença da coluna empacotada com CNTs, houve uma retenção de 98,92% de BSA na primeira injeção. Após a décima segunda injeção a retenção de BSA ainda foi de aproximadamente 38%. Estes resultados mostram que os CNTs apresentam boa adsorção de BSA e, após injeções sequenciais a capacidade de adsorção vai diminuindo devido à ocupação dos sítios ativos. Deste modo,

podemos observar que a extração de Cd^{2+} diretamente de amostras proteicas com os CNTs não seria possível. Haveria uma competição dos íons Cd^{2+} com as proteínas da amostra pelos sítios ativos dos CNTs, as proteínas das amostras poderiam ser introduzidas no detector na etapa de eluição e, passar os CNTs proporcionando uma extração inadequada com baixa recuperação, precisão e exatidão.

Nos ensaios realizados com a coluna empacotada com RACNTs, observa-se que o pico apresenta uma dispersão maior, comparado ao padrão, e sua área (0,0804) é estatisticamente igual à área do padrão (0,0800) (Teste t de Student, p. 0,05), mostrando que 100% das proteínas foram excluídas. A dispersão maior, obtida para o ensaio com coluna de RACNTs, já era esperado uma vez que a introdução de coluna no sistema de HPLC proporciona este efeito. Foram realizadas vinte injeções sequenciais de solução de BSA no sistema contendo a coluna de RACNTs e não houve variação significativa na área dos picos em todos os ensaios ($\text{RSD} < 0,5\%$). Estes resultados mostram que os RACNTs são capazes de excluir as proteínas das amostras injetadas sem perda de suas propriedades após várias injeções.

Figura 5 - Ensaio de exclusão de proteínas em sistema de HPLC com detecção a 280 nm. a) Pico de referência onde não há coluna no sistema, com colunas empacotadas com RACNTs (b) e CNTs (c).

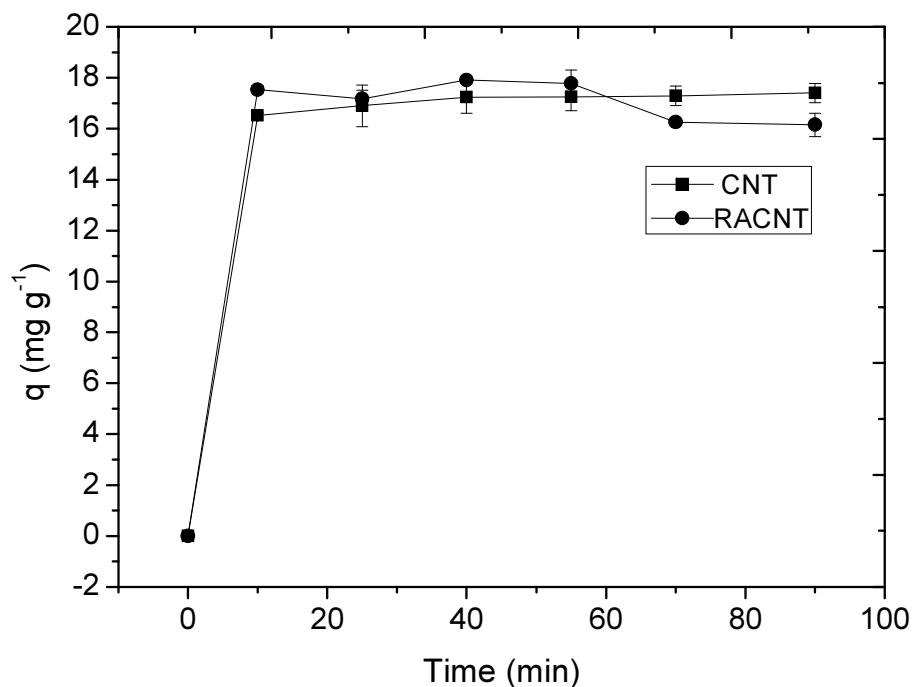


Fonte: Do Autor

O estudo de cinética de adsorção de íons Cd^{2+} nos CNTs e RACNTs foi realizado com a utilização de uma concentração de Cd^{2+} de 50 mg L^{-1} e 10 mg de material em um intervalo de tempo que variou de 10 a 90 min. Na Figura 6 nota-se que para os dois materiais estudados a adsorção de Cd^{2+} atingiu um equilíbrio em 10 min. A literatura mostra que os CNTs podem ser

oxidados de diferentes formas e o tempo de equilíbrio com íons Cd^{2+} pode variar, dependendo da concentração estudada e do pH da solução, em um intervalo de 5 – 50 min^{167,168,169}. A remoção rápida de Cd^{2+} para os RACNTs, com o alcance de equilíbrio em um período curto de tempo, é uma indicação de que o adsorvente é eficiente e possibilita o desenvolvimento de um método online rápido para remoção de Cd^{2+} . Considerando o tempo de equilíbrio obtido no nosso estudo (10 min) e também outros valores apresentados na literatura^{167,168,169}, os ensaios de isoterma foram efetuados com 30 minutos de interação entre os íons Cd^{2+} e os materiais.

Figura 6 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de Cd^{2+} (50 mg L^{-1} ; pH 7,00; $25 \text{ }^\circ\text{C}$) nos CNTs e RACNTs.

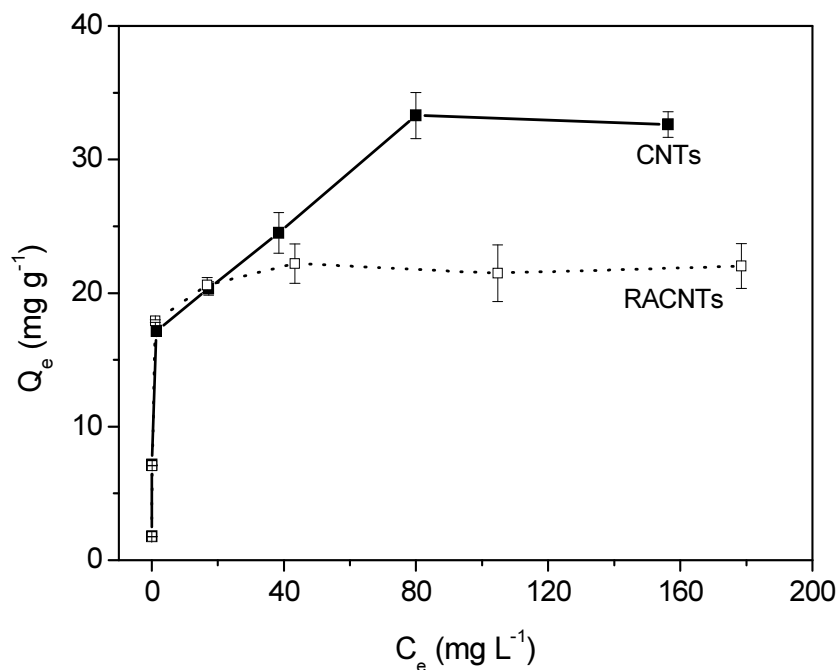


Fonte: Do Autor

No estudo de isotermas de adsorção de íons Cd^{2+} nos CNTs e RACNTs, 10 mL de solução de Cd^{2+} na faixa de concentração de 5 - 300 mg L^{-1} , foram empregadas. Os resultados de Q_e (quantidade de Cd^{2+} em mg adsorvido por g de material no ponto de equilíbrio) em função de C_e (concentração de Cd^{2+} no sobrenadante após o equilíbrio) obtidos nos ensaios são mostrados na Figura 7. Nota-se que a quantidade de íons adsorvidos aumenta de acordo com a concentração em solução até atingir um máximo para os dois materiais. Para os ensaios nas concentrações de Cd^{2+} na faixa de 5 a 80 mg L^{-1} temos um comportamento de adsorção igual para os CNTs e RACNTs. Para os ensaios com valores acima de 80 mg L^{-1} uma menor

capacidade adsorptiva pode ser observado para os RACNTs em comparação com os CNTs. Estes resultados eram esperados uma vez que a camada de proteína faz com que o acesso dos íons Cd^{2+} nos sítios do sorvente seja mais difícil. Além disso, a camada de BSA pode diminuir o número de sítios ativos disponíveis dos CNTs. Porém, esta capacidade adsorptiva mais baixa dos RACNTs não inviabilizou a aplicação porque a detectabilidade obtida no método desenvolvido foi suficiente para analisar Cd^{2+} em concentrações mais baixas do que os valores encontrados no soro humano de pessoas não expostas¹⁹.

Figura 7 - Comportamento da adsorção de íons Cd^{2+} (concentração estudadas na faixa de 5 - 300 mg L^{-1} pH 7,00, 25 °C) nos adsorventes CNTs e RACNTs.

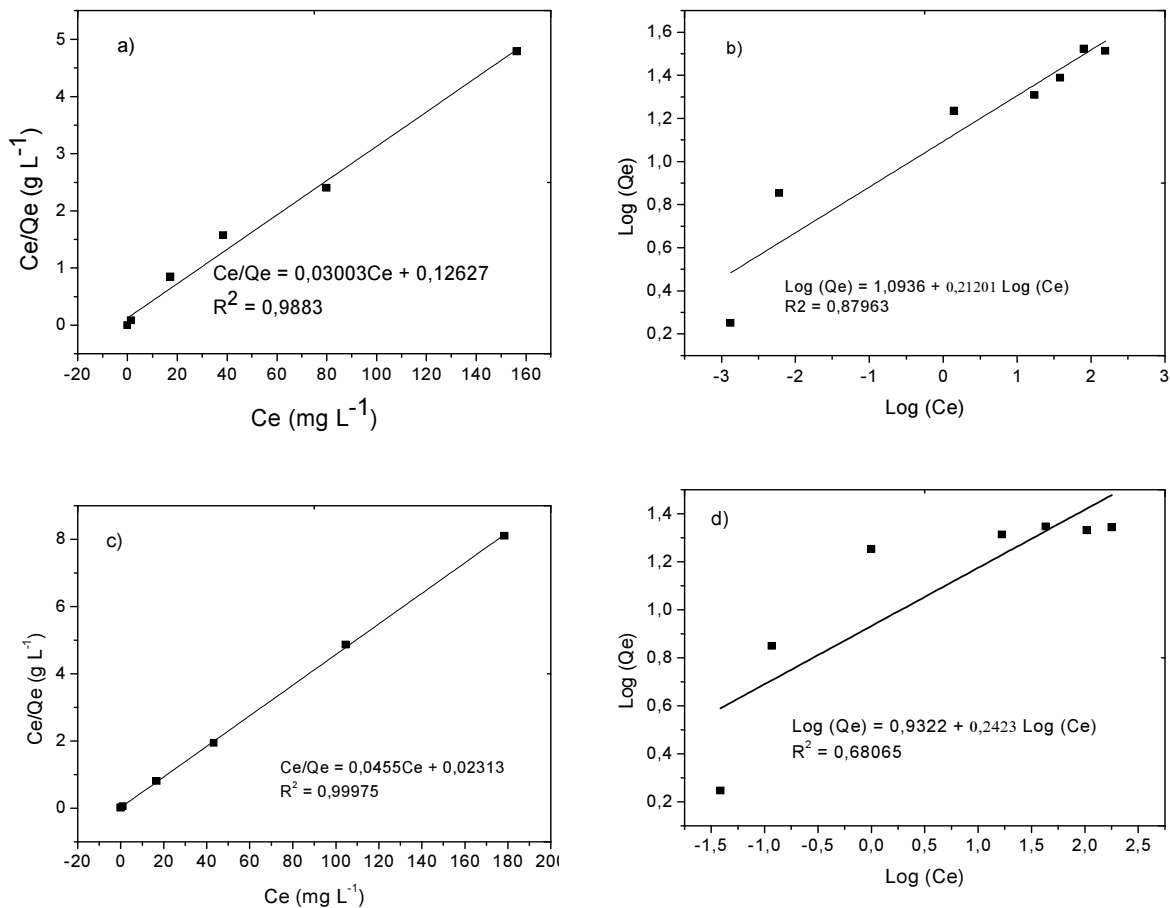


Fonte: Do Autor

Os resultados obtidos nos experimentos de estudo de isoterma para os CNTs e RACNTs foram linearizados de acordo com os modelos matemáticos de Langmuir ($f(C_e/Q_e) \times C_e$) e Freundlich ($f(\log(Q_e) \times \log(C_e))$)^{167,168} (Figura 8). Para os dois materiais os melhores ajustes foram obtidos para o modelo de Langmuir ($r \geq 0,99$ para os CNTs e RACNTs; Tabela 3). Os resultados mostram que a capacidade máxima adsorptiva de Cd^{2+} nos CNTs ($33,3 \text{ mg g}^{-1}$) é maior que a dos RACNTs ($22,98 \text{ mg g}^{-1}$). A capacidade máxima adsorptiva de Cd^{2+} para os CNTs oxidados está de acordo dados apresentados por outros autores^{167,168} onde variou de $10,86$ ¹⁷⁰- $92,59$ ¹⁷¹. Uma característica essencial para a isoterma de Langmuir pode ser expressa por uma constante adimensional chamado parâmetro de equilíbrio¹⁷¹ ($R_L = 1/(1+KC_0)$), onde C_0 é a maior

concentração inicial de Cd^{2+} (mg L^{-1}) utilizada no estudo de isoterma. O valor de R_L indica o tipo de isoterma, desfavorável ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorável ($0 < R_L < 1$) ou irreversível ($R_L = 0$). O R_L obtido para RACNTs no estudo de adsorção foi de 0,092 mostrando que a adsorção de Cd^{2+} nos RACNTs é favorável e é compatível com outros trabalhos¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. O melhor ajuste nos ensaios para o modelo de Langmuir sugere que os adsorventes apresentam sítios ativos distribuídos homogeneamente em monocamadas e que cada sítio ativo retém um íon Cd^{2+} e todos os sítios são energeticamente e estericamente independentes da quantidade do adsorvente^{172,173}.

Figura 8 - Aplicação dos modelos lineares de Langmuir (a e c) e Freundlich (b e d) para os dados obtidos nos ensaios de isotermas para os CNTs (a e b) e RACNTs (c e d).



Fonte: Do Autor

Tabela 3 - Parâmetros dos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich obtidos para os CNTs e RACNTs e seus respectivos erros.

	Parâmetros	Valores	R ²	Erro padrão
CNTs	Parâmetros para o modelo de Langmuir			
	Q _m (mg g ⁻¹)	33,30	0,9883	1,475
	K (L mg ⁻¹)	0,238		0,171
	Parâmetros para o modelo Freundlich			
	K	12,40	0,8796	1,150
	B	0,212		0,032
RACNTs	Parâmetros para o modelo Langmuir			
	Q _m (mg g ⁻¹)	21,98	0,9998	0,141
	K (L mg ⁻¹)	1,967		1,939
	Parâmetros para o modelo Freundlich			
	K	8,555	0,6810	1,257
	B	0,2423		0,065

Fonte: Do Autor

Nota: Equação para o modelo de Langmuir: $Q_e = KQ_m C_e / (1 + KC_e)$; Equação para o modelo de Freundlich $Q_e = KC_e^\beta$; C_e = concentração de equilíbrios para os íons; Q_e = capacidade adsorptiva do material no equilíbrio com uma determinada concentração de íons; Q_m = capacidade adsorptiva máxima do material (mg g⁻¹); K = parâmetro que relata a afinidade do adsorvato com o adsorvente, β = parâmetro empírico que relata a heterogeneidade da superfície do adsorvente.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FLUXO

Após a caracterização, 25 mg de RACNTs foram usados para preencher uma coluna de extração em fase sólida de fluxo (fabricada em polipropileno, com diâmetro interno de 2 mm e 1,5 cm de comprimento) e inserido no sistema FIA apresentado na Figura 1. O sistema de extração/pré-concentração direta de Cd²⁺ de amostras de soro humano com detecção por TS-FF-AAS foi otimizado com objetivo de maximizar a resposta analítica e obter uma detectabilidade compatível com as concentrações encontradas nas amostras de interesse.

Todas as etapas da otimização do método foram realizadas usando solução padrão de Cd²⁺ 50 µg L⁻¹, preparadas em solução tampão contendo 44mg mL⁻¹ de BSA (para simulação de amostras de soro humano em termos de concentração proteica) e uma alça de amostragem de 0,5 mL.

A vazão da solução de limpeza (Figura 1) foi avaliada na faixa de 0,5 a 1,0 mL min⁻¹. O sinal analítico foi igual para as vazões de 0,5 e 0,75 mL min⁻¹ e diminuiu para valores superiores de vazão. Considerando que, a solução de limpeza carrega a amostra pela coluna na etapa de pré-concentração, temos que a vazão de pré-concentração é a mesma que a de limpeza. Assim,

provavelmente a elevação da vazão de limpeza proporciona um baixo tempo de contato dos íons Cd^{2+} com o sorvente proporcionando uma diminuição no sinal. Adicionalmente, quando altas vazões são usadas, a pressão do sistema aumenta com a percolação das amostras de soro humano, causando vazamentos e imprecisões. Assim, a vazão de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ para a solução de limpeza foi selecionada para garantir o funcionamento e assegurar melhor detectabilidade e frequência analítica.

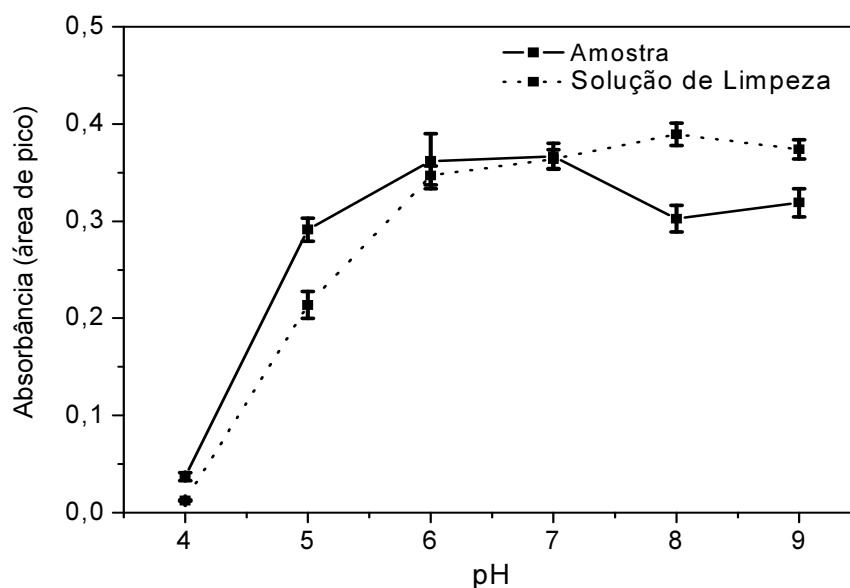
Durante a análise sequencial, utilizando um sistema sem a alça de condicionamento (ver alça de condicionamento na Figura 1), quando um volume de amostra foi injetado (Figura 1 a), a amostra chegou rapidamente na coluna de RACNTs que está preenchida com resíduos de eluente (HNO_3) da coluna (da análise anterior, Figura 1b). Nesse caso, os resíduos de HNO_3 proporcionaram a precipitação das proteínas da amostra causando entupimentos na coluna e também prejudicam a retenção de íons Cd^{2+} . Assim, uma alça de condicionamento foi inserida no sistema, entre a coluna de RACNTs e a alça de amostragem, como pode ser visto na Figura 1. O volume da alça de condicionamento necessário para a limpeza completa da coluna de SPE foi de 300 uL . Com essa configuração para o sistema FIA, durante a etapa de eluição/amostragem, a alça de condicionamento é preenchida com uma solução de tampão fosfato ($7,0, 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) e, na etapa de pré-concentração (Figura 1b) a solução é percolada através da coluna de RACNTs removendo todo o resíduo de eluente antes da passagem da amostra. Após a passagem da amostra proteica pela coluna, faz-se necessário a percolação sequencial de uma solução de lavagem na coluna de RACNTs para remover todas as proteínas para que não sejam conduzidas para o detector na etapa de eluição. Assim, um maior tempo de extração foi fixado para que a solução de limpeza remova os resíduos de ácido da coluna, a amostra seja percolada e uma fração de solução de limpeza elimine as proteínas da coluna após a extração. O tempo necessário para a pré-concentração e limpeza total da coluna foi de $4,5 \text{ min}$, que foi o tempo fixado para os ensaios. Considerando a vazão de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$, este tempo foi suficiente para percolar $300 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de limpeza (antes da extração), $2,00 \text{ mL}$ de amostra e $1,08 \text{ mL}$ de solução de limpeza após a extração. Extrações realizadas em tempos inferiores a $4,5 \text{ min}$ não foram suficientes para eliminar as proteínas da amostra, causando entupimentos na coluna e no capilar cerâmico (do sistema de detecção) ou dificultando a formação do spray térmico no detector.

Além da capacidade de eliminação de proteínas, a solução de limpeza deve ser adequada para promover a adsorção efetiva dos íons Cd^{2+} nos RACNTs uma vez que também é utilizada como solução de condicionamento, como informado anteriormente. Por esta razão, a solução de limpeza e pH da amostra foram estudadas na faixa de pH de $4,0$ a $9,0$ utilizando $0,002 \text{ mol L}^{-1}$

¹ de tampão acetato ($4,0 \leq \text{pH} \leq 6,0$) ou fosfato ($7,0 \leq \text{pH} \leq 9,0$). Os resultados do estudo são mostrados na Figura 9. Nota-se que os melhores sinais de Cd^{2+} foram obtidos para extrações em $\text{pH} = 6,0$ ou superior. Este resultado atesta a presença de grupos carboxílicos nos CNT após tratamento ácido¹⁶⁶⁻¹⁷¹, uma vez que o pH ótimo de adsorção ($6,0$) é maior do que os valores de pK_a para os grupos carboxílicos. Assim, estes grupos são ionizados negativamente, interagindo com os íons Cd^{2+} por meio de forças eletrostáticas⁸⁰. É importante notar, nestes valores de pH que, que as proteínas, tanto da camada dos RACNTs, como da amostra, são ionizadas negativamente, porque o pH é maior do que o ponto isoelétrico da BSA ($4,7 < \text{pI} < 5,6$)^{174,175}. Esta ionização causa repulsão eletrostática entre ambos, evitando a retenção de proteína na superfície do RACNTs.

Para $\text{pH} 5,0$ ou inferior (pH de carga zero para BSA), houve um aumento da pressão no sistema devido ao bloqueio dos RACNTs por proteínas da amostra. Este efeito pode ser explicado pela baixa capacidade de exclusão de proteínas dos RACNTs, uma vez que não há repulsão eletrostática entre as proteínas, tanto da amostra como da camada de BSA. Além disso, o sinal analítico baixo para Cd^{2+} obtidas com estes valores de pH , pode ser atribuída à percolação ineficiente da amostra através dos RACNTs. Assim, o $\text{pH} 7,0$ (tampão fosfato) foi selecionado como a condição de trabalho devido ao menor erro experimental em comparação com outros valores de pH s.

Figura 9 - Efeito do pH da solução de tampão e da amostra na absorbância (área de pico).

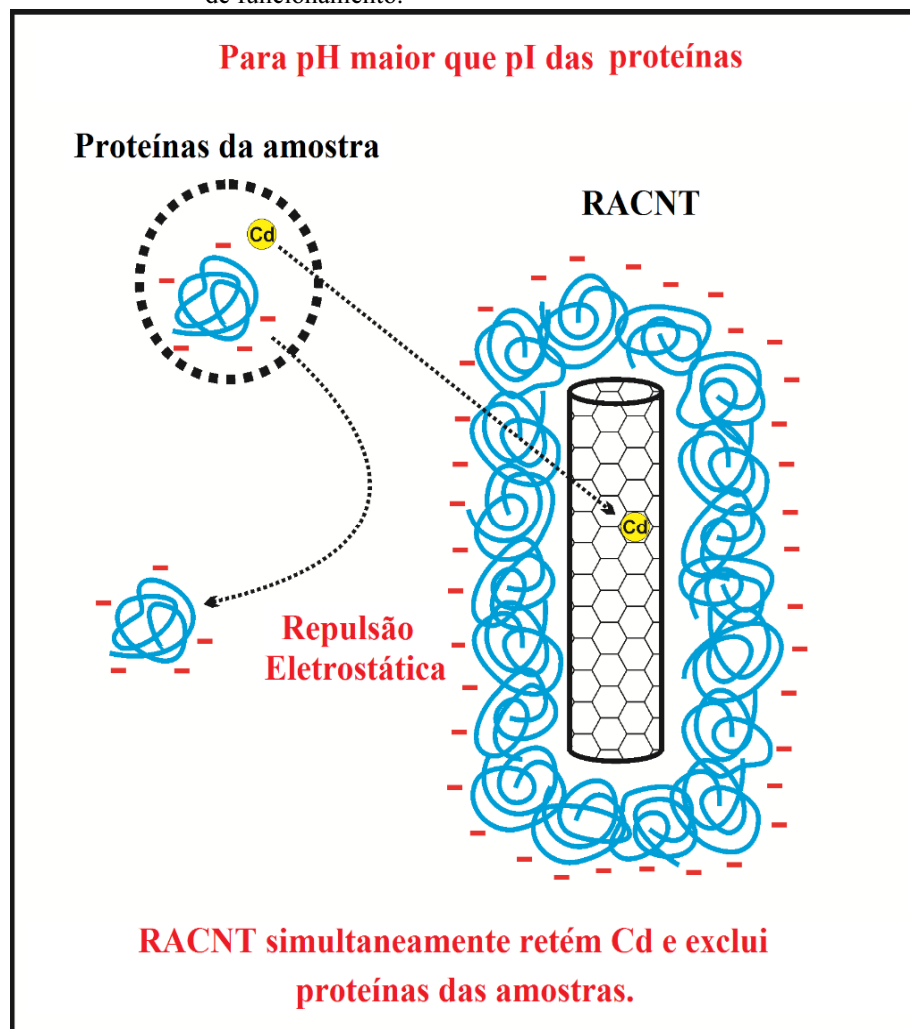


Fonte: Do Autor

O valor do pH da amostra também avaliado entre 4,0 e 9,0 pela diluição da amostra em solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão de acetato ($4,0 \leq \text{pH} \leq 6,0$) ou fosfato ($7,0 \leq \text{pH} \leq 9,0$). Os resultados (Figura 9) são muito semelhantes aos obtidos durante a otimização solução de lavagem, e o pH 7,0 (tampão fosfato) também foi selecionado para os experimentos.

Considerando as caracterizações realizadas para o material e os resultados para exclusão de proteínas e retenção de Cd^{2+} , é apresentado na Figura 10 a representação esquemática dos RACNTs e o princípio básico de exclusão e adsorção.

Figura 10 - Representação esquemática dos RACNTs e seu princípio básico de funcionamento.



Fonte: Do Autor

O efeito da concentração do tampão fosfato da solução de lavagem também foi avaliado entre $0,001$ - $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ como mostra a Figura 11. As áreas de pico de Cd^{2+} aumentaram cerca de 20% quando a concentração de tampão foi aumentada $0,001$ - $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando

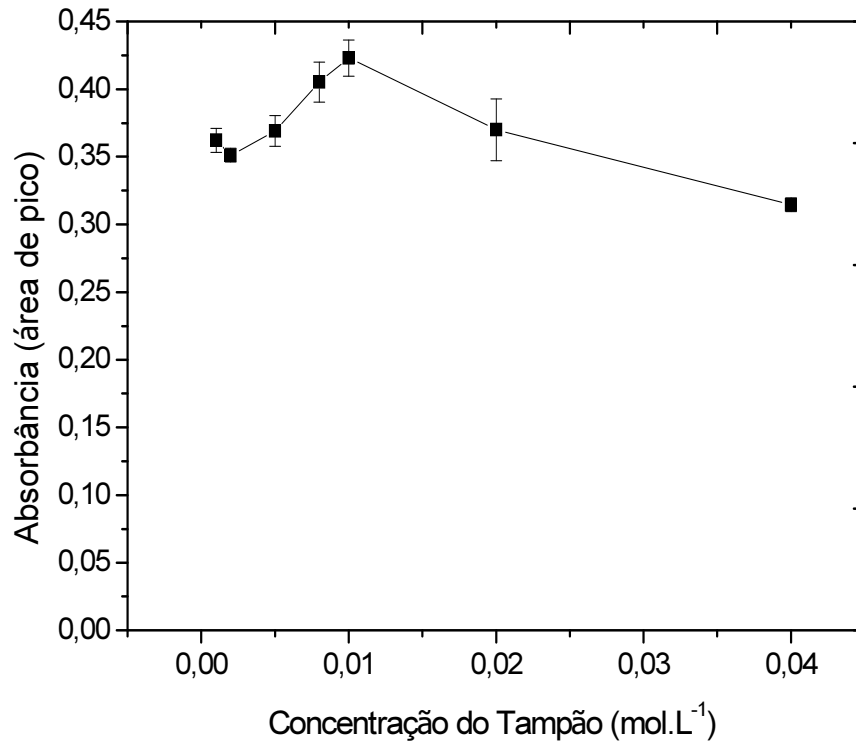
um efeito “salting-out”. No entanto, para concentração superior a $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ a resposta analítica diminuiu, provavelmente devido à elevada força iônica que causou a eluição Cd^{2+} . Desta forma a solução tampão fosfato (pH 7,0) na concentração de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada como a solução de limpeza da coluna e também como solução diluente para a amostra.

A resposta de área do pico aumentou em aproximadamente 28% quando o volume da amostra foi aumentado de 0,5 a 2,0 mL. Este resultado demonstra que a capacidade máxima de adsorção ainda não foi alcançada. No entanto, volumes de amostra maiores que 2 mL não foram avaliadas, uma vez que o volume de amostra de sangue, para obter o soro, que pode ser removido dos pacientes é limitado com uso de tubos comerciais.

Foram realizados ensaios com o aumento da massa de RACNTs no sistema de extração/pré-concentração. Para o aumento da massa foram estudadas colunas com dimensões maiores (diâmetro e comprimento). O aumento da massa de RACNTs utilizando colunas com comprimento maior que 1,5 cm proporcionaram uma elevação na pressão do sistema gerando vazamentos. Colunas com diâmetro maior que 2 mm foi possível o uso de massas superiores a 40 mg de RACNTs. Porém, devido a maior dispersão da amostra e do eluente na coluna de pré-concentração o sinal de absorbância (área de pico) diminuiu consideravelmente. Assim, foi fixado a massa de RACNTs em 25mg.

A concentração do eluente (HNO_3) foi avaliado nas concentrações de 0,05, 0,10 e 0,20 mol L^{-1} . A absorbância diminuiu quando se utilizou HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se constante para as concentrações de 0,1 e 0,2 mol L^{-1} . Assim, a concentração de 0,1 mol L^{-1} foi utilizada para eluição dos íons Cd^{2+} da coluna de RACNTs.

Figura 11 - Efeito da concentração de tampão fosfato na extração/pré-concentração de Cd^{2+} na absorbância (área de pico).

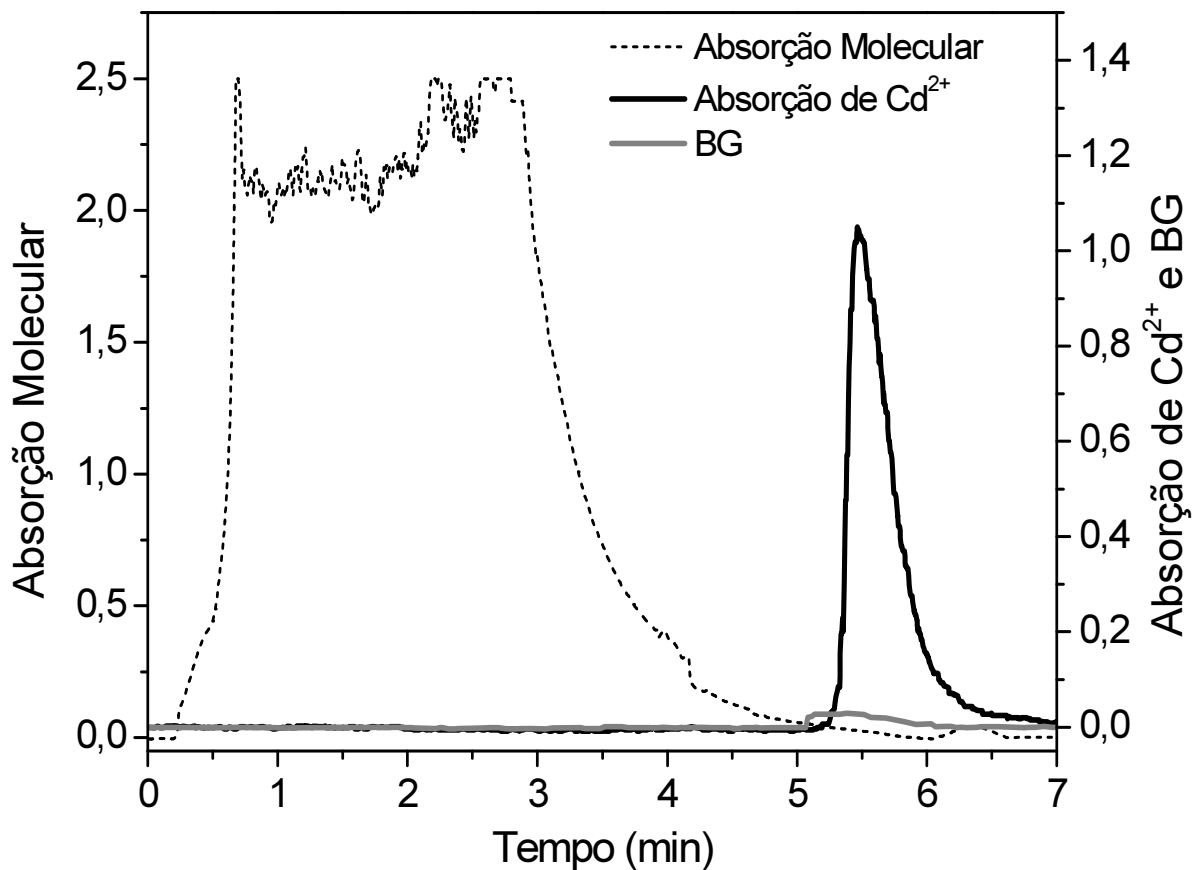


Fonte: Do Autor

Após a etapa de otimização foram realizados ensaios com amostra real de soro humano em substituição à amostra de soro humano sintético ($\text{BSA } 44 \text{ mg mL}^{-1}$). Observou-se uma viscosidade mais elevada para as amostras reais o que gerou aumento na pressão do sistema FIA. Para evitar problemas de vazamentos no sistema FIA, foram avaliadas a diluição da amostra em tampão fosfato. A proporção de diluição mais adequada ao sistema foi de 3:7 (amostra : tampão fosfato). Para avaliar o sistema, após a otimização quanto à adsorção de Cd^{2+} e a exclusão de proteínas, uma amostra de soro humano diluído em tampão fosfato (3:7) foi enriquecido com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} e injetado no sistema de fluxo. As moléculas (proteínas) e os átomos (Cd) foram monitorados simultaneamente. Para a monitorização de absorção molecular, um espectrofotômetro (280 nm) foi acoplado na saída da solução de limpeza (Figura 1). Como mostrado na Figura 12, um tempo de extração de 4,5 minutos foi suficiente para excluir todas as proteínas presentes na coluna de RACNTs devido ao fim do pico de absorção molecular. Após 4,5 min, o sistema foi comutado e a coluna de RACNTs foi colocada no caminho do TS-FF-AAS, onde o Cd^{2+} foi eluído e analisado. Nota-se na Figura 12 um sinal de

fundo (BG) muito baixo para o sistema de detecção por TS-FF-AAS indicando a ausência de proteínas retidas nos RACNTs após a etapa de extração. Além disso, o perfil do “*spray*” térmico do sistema de detecção por TS-FF-AAS não foi alterado após a comutação da coluna, ao contrário do que é observado quando o soro é injetado diretamente no sistema (o tubo capilar responsável pela formação do “*spray*” entope, devido ao elevado nível de proteínas e a alta viscosidade da amostra).

Figura 12 - Resposta de absorção atômica e molecular para a injeção de amostra de soro humano (diluído 3:7 em tampão fosfato) fortificado com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} no sistema otimizado. BG é o sinal de fundo para o sistema de detecção por TS-FF-AAS.



Fonte: Do Autor

Com base em nossas experiências em um trabalho anterior⁸⁰ e experiências de outros autores⁸¹⁻⁸⁵ o efeito de interferência de íons coexistindo com íons Cd^{2+} na adsorção em CNTs é observado para os íons Zn^{2+} ($\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$), Pb^{2+} ($\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$), Al^{3+} ($\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$), Cu^{2+} ($\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$), Ni^{2+} ($\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$) e Ca^{2+} ($\geq 10 \text{ mg L}^{-1}$). Nota-se que as concentrações que proporcionam efeitos de interferência são elevadas e não são encontradas em amostras de soro humano. Além disso,

os resultados de exatidão e de precisão mostrados na secção seguinte demonstrou que os efeitos de interferências na extração de Cd^{2+} não apresentou efeitos significativo para de amostras de soro humano.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO E APLICAÇÕES

O método para a análise de Cd^{2+} em amostras de soro humano foi validado. Os padrões de calibração analítica foram preparados pela fortificação de um “*pool*” de 25 amostras de soro humano de indivíduos não expostos a cádmio. Esta técnica de calibração é conhecida como calibração com matriz correspondente e se faz necessária quando a técnica de extração não é uma extração exaustiva, não sendo possível a remoção de 100% de Cd^{2+} da matriz^{176,136,59,177}, ao contrário do que acontece quando a amostra é mineralizada e todos os analitos são injetados no sistema e os calibradores podem ser preparados em solução aquosa.

A Figura 13 mostra os registros dos sinais e a curva analítica obtida nas análises de um “*pool*” de soro humano após fortificação com Cd^{2+} nas concentrações entre 0,80 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considerando a diluição em tampão fosfato na proporção de 3:7 (v:v), as concentrações em soro humano correspondem a concentrações analíticas de Cd^{2+} de 0,24 a 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a obtenção da curva de calibração no método bioanalítico foi considerado as concentrações de Cd^{2+} no soro humano. Os picos observados para as análises do branco correspondem a concentração de Cd^{2+} que pode variar de 0,24 a 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esta concentração é naturalmente presente nas amostras de soro humano considerando que a literatura estipula que os valores de referência para indivíduos não expostos seja de aproximadamente 0,6 - 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁹.

Os parâmetros de validação do método estão apresentados na Tabela 4. O método foi linear e o limite de quantificação está próximo aos valores de referência¹⁹, qualificando o método a ser utilizado para determinar Cd^{2+} em indivíduos não expostos. A precisão intra-dias e inter-dias foram adequados, com RSD menor do que 10,1%. A exatidão foi avaliada por testes de adição e recuperação, analisando seis amostras de soro humano antes e após a fortificação com diferentes níveis de concentração de Cd^{2+} . As recuperações obtidas (Tabela 5) variaram de 92,7% a 110,4%, atestando a eficácia do método e o mínimo de efeito de interferência para este tipo de amostra. As concentrações de cádmio nas amostras de soro humano variaram entre não detectadas a 2,52 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, as amostras de 1-3 da Tabela 5 foram mineralizados usando HNO_3 e H_2O_2 em chapa aquecida, e as concentrações de Cd^{2+} foram determinadas por TS-FF-AAS convencional. Os resultados obtidos foram estatisticamente iguais aos obtidos pelo método proposto (Teste t de Student, p. 0,05), conforme mostrado na Tabela 5.

Os cálculos dos parâmetros relacionados ao sistema de extração/pré-concentração em fluxo foram realizados conforme apresentado na seção 2.3 desta tese. Nos cálculos considerou-se a inclinação da curva de calibração ($m=0,1226 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$) para a concentração analítica¹⁵⁵ dos

padrões de Cd^{2+} no soro humano diluído ($0,24$ a $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e a equação da curva analítica de Cd^{2+} com detecção direta por TS-FF-AAS em função da área de pico obtida ($A=0,0113[\text{Cd}^{2+}] + 0,001$, $R^2 = 0,9994$, onde A corresponde a absorvância integrada do pico).

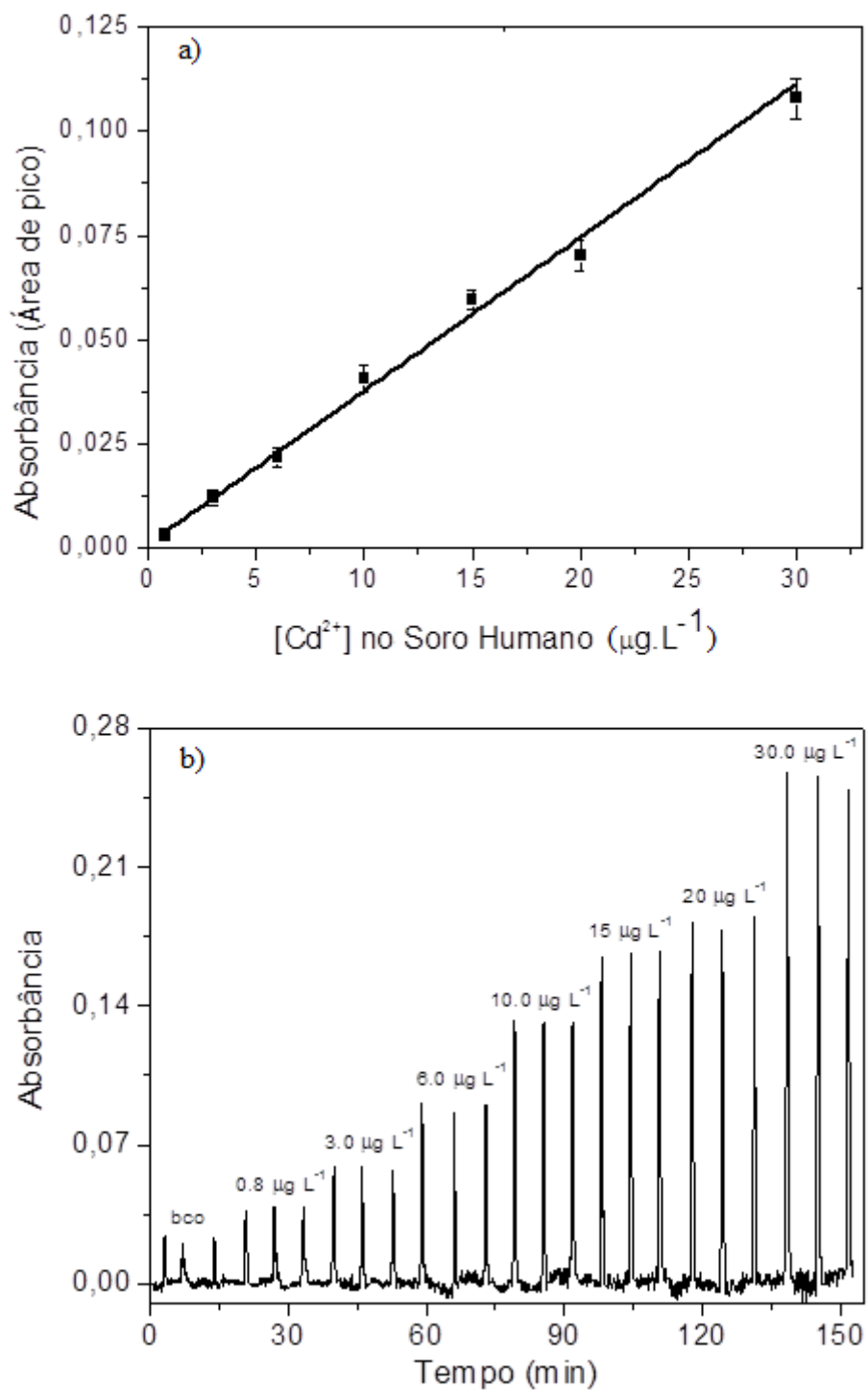
Tabela 4 - Parâmetros analíticos para extração e determinação direta de Cd^{2+} de amostras de soro humano usando o método proposto.

Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,80 - 30,00	
Equação	$A = 0,0368 [\text{Cd}^{2+}] + 0,003$	
Coefficiente de Correlação	0,993	
Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,24	
Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,80	
Fator de Enriquecimento	10,8	
Frequência de Amostragem (h^{-1})	8,6	
Índice de consumo de amostra (mL)	0,185	
Eficiência de concentração (min^{-1})	4,04*	
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
Precisão Intra-dias (5 replicas)	0,8	7,8
	15,0	3,1
	30,0	4,0
Precisão Inter-dias (3 dias)	0,8	10,1
	15,0	7,5
	30,0	5,3

Fonte: Do Autor

Nota: *Considerando 2,67 e 1,83 min como o tempo de pré-concentração e tempo de limpeza, respectivamente.

Figura 13 - Curva analítica (a) e respectivos registos de sinal (b) para extração/pré-concentração de Cd^{2+} em RACNTs para padrões preparados em “pool” de soro humano 3:7 (v/v) em tampão fosfato. OBS: O Diagrama (b) corresponde ao registro dos sinais a partir de 1 min de cada medida não representando o tempo total de análise.



Fonte: Do Autor

Tabela 5 - Determinação de Cd²⁺ em amostras de soro humano pelo método proposto e pelo método convencional de TS-FF-AAS após mineralização, n=3.

Amostra	Adicionado (µg L⁻¹)	Método Proposto (µg L⁻¹)	Recuperação para o método Proposto (%)	TS-FF-AAS (µg L⁻¹)*
1	0	1,11 ± 0,02	-	0,99 ± 0,02
	10,0	10,8 ± 0,1	97,2	-
2	0	1,4 ± 0,1	-	1,3 ± 0,1
	14,0	14,4 ± 0,1	93,5	-
3	0	2,1 ± 0,1	-	2,3 ± 0,2
	2,0	3,8 ± 0,2	92,7	-
4	0	2,5 ± 0,1	-	-
	25,0	30,5 ± 0,9	110,9	-
5	0	ND	-	-
	20,0	18,8 ± 0,3	94,0	-
6	0	< LOQ	-	-
	5,0	5,4 ± 0,2	108,0	-

Fonte: Do Autor

Nota: *As amostras foram analisadas por TS-FF-AAS convencional após mineralização. ND: não detectado.

Cada coluna de RACNTs apresentou o mesmo desempenho durante, pelo menos, 300 extrações sequências de Cd²⁺ em amostras de soro humano, sem qualquer procedimento de preparação de amostra, atestando uma elevada vida útil para os RACNTs.

Considerando os dados revisados na Tabela 1, nota-se que a aplicação dos CNTs para extrair diferentes analitos inorgânicos já foi extensivamente estudada. Os CNTs foram funcionalizados de diferentes formas e demonstraram uma elevada capacidade de extrair diferentes analitos inorgânicos em diferentes amostras (após etapas de mineralização). Desse modo, os resultados do trabalho e os apresentados na literatura, mostram que os RACNTs sintetizados (BR 10 2014 001074-2) podem ser utilizados para extrair diferentes analitos inorgânicos de fluidos proteicos (amostras biológicas, leite, etc) e podem ser associados a diferentes técnicas de detecção. Além disso, a revisão de materiais de acesso restrito apresentada na Tabela 2 e dados revisados por RAVELO-PÉREZ e colaboradores¹⁷⁸, mostram

que os RACNTs podem ser aplicados para extrair diferentes compostos orgânicos de matrizes biológicas e proteicas e, podem ser utilizados como recheio de colunas cromatográficas associadas aos diferentes sistemas de detecção.

Por fim, ressalta-se que os métodos para a determinação Cd^{2+} em fluidos biológicos são normalmente realizados após uma etapa de mineralização para evitar o efeito de matriz. Por outro lado, o presente método é o primeiro que propõe uma limpeza em linha dos resíduos de proteínas, evitando-se a necessidade de etapas complexas de mineralização das amostras. De acordo com a Tabela 6, a detectabilidade do presente método é comparável a obtida com a espectrometria de absorção atômica (ETAAS). Além disso, o método pode ser utilizado para analisar o Cd^{2+} em amostras de soro humano uma vez que os valores de referência para o Cd^{2+} varia de 0,6 a 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁹. De acordo com nossa revisão da literatura, não existem métodos publicados sobre determinação Cd^{2+} em amostras de sangue ou leite por TS-FF-AAS. Acreditamos que a principal dificuldade seja a elevada concentração de proteína e a alta viscosidade da amostra, que causa perturbações na formação do spray térmico, entupimento do capilar cerâmico do TS-FF-AAS e imprecisões.

Tabela 6 - Comparação de diferentes métodos de espectrometria de absorção atômica para análise de Cd^{2+} em fluidos proteicos.

Técnica	Amostra	Etapa prévia de preparo de amostra	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
ETAAS	Sangue Total	Precipitação de proteínas	0,026	179
ETAAS	Sangue Total	Sem preparação de amostra	0,54	180
FAAS	Leite	Extração em fase sólida	0,2	181
FAAS	Soro humano	Extração por ponto nuvem	2,0	182
FAAS	Leite	Extração ácida	14,0	183
TS-FF-AAS	Soro humano	Sem preparação de amostra	0,24	Este trabalho

Fonte: Do Autor

6 CONCLUSÃO

Os RACNTs mostraram uma capacidade elevada para extrair cádmio diretamente de matrizes biológicas (por exemplo, soro humano), evitando-se os procedimentos convencionais de preparação de amostras morosos, como os que se baseiam em um forno de micro-ondas e de combustão. As proteínas da matriz das amostras biológicas foram quantitativamente excluídas, enquanto cádmio foi concentrado com elevados fatores de enriquecimento. Cada coluna apresentou o mesmo desempenho durante, pelo menos, cerca de 300 extrações sequenciais de soro humano, sem qualquer procedimento de preparação da amostra, atestando a sua longa vida útil.

O método proposto foi devidamente validado para a determinação on-line de Cd^{2+} , o que apresentou baixo limite de quantificação, elevada precisão e exatidão, e o baixo consumo de reagente e de amostra. Além disso, a frequência de amostragem (considerando-se as etapas de preparação e análise da amostra) é significativamente menor em relação aos procedimentos convencionais baseadas em espectrometria de absorção atômica devido às etapas externas de preparação de amostras (combustão, digestão em forno de micro-ondas, entre outros) para os procedimentos convencionais.

Considerando as características de adsorção dos CNTs para reter diferentes analitos inorgânicos¹⁸⁴ e orgânicos¹⁷⁸ os RACNTs, sintetizados neste trabalho juntamente com os demais patenteados (depósito BR 10 2014 001074-2), podem ser utilizados para extrair diferentes analitos de fluídos proteicos e aplicados como recheio de colunas cromatográficas.

REFERÊNCIAS

-
- ¹ BROWN, R. J. C.; MILTON, M. J. T. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n.3, p. 266-274, 2005.
- ² BECKER, J. S. Trace and ultratrace analysis in liquids by atomic spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 243-254, 2005.
- ³ AMAIS, R. S., TARLEY, C.R.T. Experimental Design Approach in the Diethyldithiocarbamate-Nickel Chelate Preconcentration using Cloud Point Method and Determination by GF AAS. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, v. 53, p. 131-140, 2008.
- ⁴ TREVISAN, L. C.; DONATI, J. L.; ARAUJO, A. R. **Microwave-assisted procedures for sample preparation: Recent developments, in: Arruda, M. A. (Ed.) Trends in Sample Preparation**; New York: Nova Science Publishers, 2006.
- ⁵ FLORES, E. M. M. et al. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1051-1064, 2007.
- ⁶ SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004.
- ⁷ NETO, A. J. S. et al. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of separation Science**, v. 31, n. 1, p. 78-85, 2008.
- ⁸ BARREIRO, J. C.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B. Direct injection of native aqueous matrices by achiral–chiral chromatography ion trap mass spectrometry for simultaneous quantification of pantoprazole and lansoprazole enantiomers fractions. **Journal of Chromatography A - J CHROMATOGR A**, v. 1218, n. 30, p. 2865-2870, 2011.
- ⁹ NETO, A. J. S. et al. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v.1105, n. 1-2, p. 71-76, 2006.
- ¹⁰ CASSIANO, N. M. et al. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.
- ¹¹ MORAES, G. O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n.24, p. 7687-7696, 2013.
- ¹² HERBER, R. F. M.; STOEPLER, M. **Biological Specimens**, Elsevier, Amsterdam, 1994.

-
- ¹³ BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 451-458, 2009.
- ¹⁴ COTTON, F.A. et al. **Advanced Inorganic Chemistry**, 6 ed., John Wiley & Sons INC, New York, 1999.
- ¹⁵ DAVIS, A. C. et al. Determination of Cadmium in Biological Samples. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 1, p. 35-75, 2006.A.C.
- ¹⁶ FERREIRA, S. L. C. et al. Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, p. 358-367, 2007.
- ¹⁷ KOSSOWSKA, B. et al. Proteomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium, and lead for biomarker research: A preliminary study. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 22, p. 5317-5324, 2010.
- ¹⁸ CAMPILLO, N. et al. Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction. **Analytica Chimica Acta**, v. 390, n. 1-3, p. 207-215, 1999.
- ¹⁹ MUHAMMAD, S. et al. Assessment of concentration of lead, cadmium, chromium and selenium in blood serum of cancer and diabetic patients of Pakistan. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 33, n. 6, p. 869-873, 2011.
- ²⁰ LIN, Y. et al. Low serum zinc is associated with elevated risk of cadmium nephrotoxicity. **Environmental Research**, v. 134, p. 33-38, 2014.
- ²¹ CARRILLO-PONCE, M. L. Serum lead, cadmium, and zinc levels in newborns with neural tube defects from a polluted zone in Mexico. **Reproductive Toxicology**, v.19, n. 2, p. 149-154, 2004.
- ²² WANG, D.; DU, X.; ZHENG, W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 40-47, 2008.
- ²³ NOUIOUI, M. A. Optimization and validation of a biomonitoring method for determination of cadmium in human serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v.44, n. 7, p. 538, 2011.
- ²⁴ HUDNIK, H. et al. The determination of trace metals in human fluids and tissues: Part 1. Estimation of "Normal Values" for copper, zinc, cadmium and manganese in blood serum e liver tissue. **Analytical Chimica Acta**, v. 157, p. 143-150, 1984.
- ²⁵ POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.
- ²⁶ LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 3-16, 2000.

-
- ²⁷ CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 7, p. 1177-1233, 2003.
- ²⁸ RAO T. P.; METILDA, P. J.; GLADIS, M. Preconcentration techniques for uranium(VI) and thorium(IV) prior to analytical determination—an overview. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1047–1064, 2006.
- ²⁹ NAMIÉŠNIK, J. Trends in environmental analytics and monitoring. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2-3, p. 221-269, 2000.
- ³⁰ PYRZYŃSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Functionalized Cellulose Sorbents for Preconcentration of Trace Metals in Environmental Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 313-321, 1999.
- ³¹ LEMOS, V. A. et al. Chromotropic acid-functionalized polyurethane foam: A new sorbent for on-line preconcentration and determination of cobalt and nickel in lettuce samples. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 9, p. 1197-1204, 2006.
- ³² SOYLAK, M.; KARATEPE, A. U.; DO GAN, M. Column preconcentration/separation and atomic absorption spectrometric determinations of some heavy metals in table salt samples using amberlite XAD-1180. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 235-242, 2003.
- ³³ MARAHEL, F. et al. Sodium dodecyl sulfate coated poly (vinyl) chloride: An alternative support for solid phase extraction of some transition and heavy metals. **Chemosphere**, v. 74, n. 4, p. 583-589, 2009.
- ³⁴ SOYLAK, M.; TUZEN, M. Diaion SP-850 resin as a new solid phase extractor for preconcentration-separation of trace metal ions in environmental samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1496-1501, 2006.
- ³⁵ THURMAN, E.M.; MILLS, M.S. **Solid Phase Extraction: Principles and Practice. Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 14, p. 988, 1998.
- ³⁶ PEREIRA, M. D.; ARRUDA, M. A. Z. Preconcentration of Cd(II) and Pb(II) using humic substances and flow systems coupled to flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 146, p. 215-222, 2004.
- ³⁷ XINGGUANG, S. et al. Semi-online preconcentration of Cd, Mn and Pb on activated carbon for GFASS. **Talanta**, v. 59, n. 5, p. 989-997, 2003.
- ³⁸ FERNANDES, A. P.; MORAES, M. NETO, JAG. Flow injection AAS determination of Cd, Cu, and Pb at trace levels in using solid phase extraction. **Atomic Spectroscopy**, v. 24, n. 5, p. 179-184, 2003.
- ³⁹ FERREIRA, S. L. C. et al. Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, p. 358-367, 2007.

-
- ⁴⁰ RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2618-2641, 2010.
- ⁴¹ HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Carbon nanotubes applications in separation science: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 1-30, 2012.
- ⁴² IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- ⁴³ IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, v. 363, p. 603-605, 1993.
- ⁴⁴ BYSZEWSKI, P. et al. Fullerene and nanotube synthesis plasma spectroscopy studies. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 58, n. 11, p. 1679-1683, 1997.
- ⁴⁵ HUSSAIN, C. M.; SARIDARA, C.; MITRA, S. Modifying the sorption properties of multi-walled carbon nanotubes via covalent functionalization. **Analyst**, v. 134, n. 9, p. 1928-1933, 2009.
- ⁴⁶ ZHAO, X. et al. Preparation of high-grade carbon nanotubes by hydrogen arc discharge. **Carbon**, v. 35, n. 6, p. 775-781, 1997.
- ⁴⁷ LI, Y, H. et al. Lead adsorption on carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 357, n. 3-4, p. 263-266, 2002.
- ⁴⁸ HIRSCH, A.; VOSTROWSKY, O. Functionalization of Carbon Nanotubes. **Topics in Current Chemistry**, v. 245, p. 193-237, 2005.
- ⁴⁹ TUZEN, M. et al. Pseudomonas aeruginosa immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1563-1570, 2008.
- ⁵⁰ LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media chromatographic columns protein-immobilized and their evaluation for the analysis of drugs by direct injection of human plasma. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006.
- ⁵¹ ROSSI, D. T.; ZHANG, N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 97-113, 2000.
- ⁵² BAYSAL, A. OZCAN, M. AKMAN, S. A rapid method for the determination of Pb, Cu and Sn in dried tomato sauces with solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1399-1403, 2011.
- ⁵³ PANHWAR, A. H. et al. A new solid phase microextraction method using organic ligand in micropipette tip syringe system packed with modified carbon cloth for preconcentration of cadmium in drinking water and blood samples of kidney failure patients. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, n. 5, p. 296-302, 2015.
- ⁵⁴ KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras, fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba, F.J. Krug, 2008.

-
- ⁵⁵ BOOS, K. S.; GRIMM, C. H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 175-180, 1999.
- ⁵⁶ CASSIANO, N. M. et al. Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography. **Chirality**, v. 14, n. 9, p. 731-735, 2002.
- ⁵⁷ CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: Application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, n. 1-2, p. 1-8, 2008.
- ⁵⁸ RIEUX, L. et al. Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, n. 2, p. 169-177, 2007.
- ⁵⁹ SADILEK, P.; SATINSKY, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007.
- ⁶⁰ ANDREA, J. J. et al. Determination of scandium in acid mine drainage by ICP-OES with flow injection on-line preconcentration using oxidized multiwalled carbon nanotubes. **Talanta**, v. 124, p. 89-94, 2014.
- ⁶¹ YU, H.M. et al. Carbon Nanotubes-Loaded Silica Gel for Preconcentration of Trace Silver with Detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 12, p. 1721-1726, 2010.
- ⁶² LÓPEZ-GARCÍA, I. et al. Use of carbon nanotubes and electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of very low amounts of arsenic and antimony in Waters. **Talanta**, v. 86, p. 52-57, 2011.
- ⁶³ WU, H. et al. Simultaneous speciation of inorganic arsenic and antimony in water samples by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry with on-line solid-phase extraction using single-walled carbon nanotubes micro-column. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 1, p. 74-80, 2011.
- ⁶⁴ LI, L. et al. Hemimicelle capped functionalized carbon nanotubes-based nanosized solid-phase extraction of arsenic from environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, 182-188, 2009.
- ⁶⁵ NABID, M. R. et al. A nanocomposite made from conducting organic polymers and multiwalled carbon nanotubes for the adsorption and separation of gold(III) ions. **Microchimica Acta**, v. 175, p. 315-322, 2011.
- ⁶⁶ AFZALI, D.; GHASEMINEZHAD, S.; TAHER, M. A. Separation and Preconcentration of trace amounts of gold(III) ions using modified multiwalled carbon nanotube sorbent prior to Flame Atomic Absorption Spectrometry Determination. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 4, p. 1287-1292, 2010.

-
- ⁶⁷ SHAMSPUR, T. et al. Application of modified multiwalled carbon nanotubes as a sorbent for simultaneous separation and preconcentration trace amounts of Au(III) and (Mn(II)). **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1548-1553, 2009.
- ⁶⁸ LIANG, P. et al. Multiwalled carbon nanotubes microcolumn preconcentration and determination of gold in geological and water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 6, p. 714-717, 2008.
- ⁶⁹ SHAMSPUR, T.; MOSTAFAVI, A. Application of modified multiwalled carbon nanotubes as a sorbent for simultaneous separation and preconcentration trace amounts of Au(III) and Mn(II). **Journal Hazardous Materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1548-1553, 2009.
- ⁷⁰ POURREZA, N.; SHEIKHNAJDI, K. Multi-walled carbon nanotube modified with 1-butyl 3-methyl imidazolium hexafluoro phosphate supported on sawdust as a selective adsorbent for solid phase extraction of Bi(III). **Talanta**, v. 99, p. 507-511, 2012.
- ⁷¹ ZHONG, Y. Y. et al. Trace analysis of anions in organic matrices by ion chromatography coupled with a novel reversed-phase column for on-line sample pretreatment. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, n. 4, p. 461-464, 2011.
- ⁷² MOSTAFAVI, A. et al. Multi-walled carbons nanotubes modified with N-phenyl-1,2-hydrazinedicarbothioamide as a sorbent for separation and preconcentration of trace amounts of cadmium. **Chemia Analitczna**, v. 54, p. 459-469, 2009.
- ⁷³ MÉNDEZ, J. A. et al. A new flow injection preconcentration method based on multiwalled carbon nanotubes for the ETA-AAS determination of Cd in urine. **Talanta**, v. 85, n. 5. P. 2361-2367, 2011.
- ⁷⁴ PARODI, B. et al. Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization: Application to Cd monitoring in solid environmental samples. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 2, p. 225-230, 2011.
- ⁷⁵ WANG, J. et al. Preparation of iminodiacetic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes and its application as sorbent for separation and preconcentration of heavy metal ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1985-1992, 2011.
- ⁷⁶ YANG, B. et al. Preconcentration and determination of lead and cadmium in water samples with a MnO₂ coated carbon nanotubes by using ETAAS. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 65-69, 2011.
- ⁷⁷ NABID, M. R. et al. Preparation and application of poly(2-aminothiophenol)/MWCNTs nanocomposite for adsorption and separation of cadmium and lead ions via solid phase extraction. **Journal of hazardous Materials**, v. 203-204, n. 15, p. 93-100, 2012. M.R.
- ⁷⁸ MOHAMMADI, S. Z.; AGZALI, D.; POURTALEBI, D. Flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of lead, cadmium and nickel in different matrixes

after solid phase extraction on modified multiwalled carbon nanotubes. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 662-668, 2010.

⁷⁹ LIU, Y.; LI, Y.; YAN, X. P. Preparation, characterization, and application of L-cysteine functionalized multiwalled carbon nanotubes as a selective sorbent for separation and preconcentration of heavy metals. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 10, p. 1536-1543, 2008.

⁸⁰ TARLEY, C.R.T. et al. Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at ng L^{-1} levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 21 (2006) 1305-1313.

⁸¹ XIAO, J. P.; ZHOU, Q. X.; BAI, H. H. Application of multiwalled carbon nanotubes treated by potassium permanganate for determination of trace cadmium prior to flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n.10, p. 1266-1271, 2007.

⁸² SOYLAK, M.; UNSAL, Y. E. Use of multiwalled carbon nanotube disks for the SPE of some heavy metals as 8-hydroxquinoline complexes. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 4, p. 1297-1303, 2011.

⁸³ LIANG, P. et al. Multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the preconcentration of trace metal ions and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 1489-1492, 2004.

⁸⁴ EL-SHEIKH, A. H.; SWEILEH, J. A.; AL-DEGS, Y. Effect of dimensions of multi-walled carbon nanotubes on its enrichment efficiency of metal ions from environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 119-126, 2007.

⁸⁵ SHEIKH, A. H. E. Effect of oxidation of activated carbon on its enrichment efficiency of metal ions: Comparison with oxidized and non-oxidized multi-walled carbon nanotubes. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 127-134, 2008.

⁸⁶ PACHECO, P.H. et al. Solid phase extraction of Co ions using L-tyrosine immobilized on multiwall carbon nanotubes. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 249-253, 2009.

⁸⁷ SOYLAK, M.; UNSAL, Y. E. Simultaneous enrichment-separation of metal ions from environmental samples by solid-phase extraction using double-walled carbon nanotubes. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 4, p. 1219-1224, 2009.

⁸⁸ CHEN, S. et al. Solid-phase extraction of Cu, Co and Pb on oxidized single-walled carbon nanotubes and their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n.1, p. 247-251, 2009.

⁸⁹ AFZALI, D.; MOSTAFAVI, A. Potencial of modified multiwalled carbon nanotubes with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol as a new solid sorbent for the preconcentration of trace amounts of cobalt(II) ion. **Analytical Sciences**, v. 24, n. 9, p. 1135-1139, 2008.

-
- ⁹⁰ TAVALLALI, H. et al. Chemically modified multiwalled carbon nanotubes as efficient and selective sorbent for separation and preconcentration of trace amount of Co(II), Cd(II), Pb(II), and Pd(II). **Arabian Journal of Chemistry**, doi:10.1016/j.arabjc.2014.10.034
- ⁹¹ ZANG, Z. et al. Synthesis, characterization and application of ethylenediamine-modified multiwalled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction and preconcentration of metal ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 958-963, 2009.
- ⁹² RESENDE, M. et al. Highly integrated flow assembly for automated dynamic extraction and determination of readily bioaccessible chromium (VI) in soils exploiting carbon nanoparticle-based solid-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 7, p. 2217-2227, 2011.
- ⁹³ TUZEN, M.; SOYLAK, M. Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 1-2, p. 219-225, 2007.
- ⁹⁴ OZCAN, S. G.; SATIROGLU, N.; SOYLAK, M. Column solid phase extraction of iron(III), copper(II), manganese(II) and lead(II) ions food and water samples on multi-walled carbon nanotubes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2401-2406, 2010.
- ⁹⁵ LIU, Y. et al. Fabrication and characterization of hexahistidine-tagged protein functionalized multi-walled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction of Cu²⁺ and Ni²⁺. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1464-1471, 2009.
- ⁹⁶ VELLAICHAMY, S.; PALANIVELU, K. Preconcentration and separation of copper, nickel and zinc in aqueous samples by flame atomic absorption spectrometry after column solid-phase extraction onto MWCNTs impregnated with D2EHPA-TOPO mixture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2-3, p. 1131-1139, 2011.
- ⁹⁷ CUI, Y. et al. Novel phenyl-iminodiacetic acid grafted multiwalled carbon nanotubes for solid phase extraction of iron, copper and lead ions from aqueous medium. **Microchimica Acta**, v. 176, n. 3-4, p. 359-366, 2012.
- ⁹⁸ DURAN, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Preconcentration of some trace elements via using multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 466-471, 2009.
- ⁹⁹ LIANG, P.; DING, Q.; SONG, F. Application of multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent for preconcentration of trace copper in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 17, p. 2339-2343, 2005.
- ¹⁰⁰ XIAO, J. P.; ZHOU, Q. X.; BAI, H. H. Preconcentration of copper with multi-walled carbon nanotubes pretreated by potassium permanganate cartridge for solid phase extraction prior to flame atomic absorption spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, n. 6, p. 714-717, 2007.
- ¹⁰¹ STAFIEJ, A.; PYRZYNSKA, K. Solid phase extraction of metal ions using carbon nanotubes. **Microchemical Journal**, v. 89, n. 1, p. 29-33, 2008.

-
- ¹⁰² SOYLAK, M.; ERCAN, O. Selective separation and preconcentration of copper (II) in environmental samples by the solid phase extraction on multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1527-1531, 2009.
- ¹⁰³ TUZEN, M.; SAYGI, K. O.; SOYLAK, M. Solid phase extraction of heavy metal ions in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 2, p. 632-639, 2008.
- ¹⁰⁴ LIANG, P.; LIU, Y.; GUO, L. Determination of trace rare earth elements by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration with multiwalled carbon nanotubes. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 1, p. 125-129, 2005.
- ¹⁰⁵ ZHONG, Y. et al. A single pump column-switching technique coupled with polystyrene-divinylbenzene-carbon nanotubes column for the determination of trace anions in different concentrated organic matrices by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 686, n. 1-2, p. 1-8, 2011.
- ¹⁰⁶ ZHANG, Z. et al. Novel surface molecularly imprinted material modified multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbent for selective extraction gallium ion from fly ash. **Talanta**, vol 82, n. 1, p. 304-311, 2010.
- ¹⁰⁷ Li, L. et al. Hemimicelle capped functionalized carbon nanotubes-based nanosized solid-phase extraction of arsenic from environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, 182-188, 2009.
- ¹⁰⁸ EL-SHEIKH, A.H. et. al. Effect of oxidation and geometrical dimensions of carbon nanotubes on HG(II) sorption and preconcentration from real waters. **Desalination**, v. 270, n. 1-3, p. 214-220, 2011.
- ¹⁰⁹ SHANG, X. H. Flow injection on-line solid phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as sorbent for cold vapor atomic fluorescence spectrometric determination of trace mercury in water samples. **Atomic Spectroscopy**, v. 28, n. 1, p. 35-40, 2007.
- ¹¹⁰ SAVIO, M. et al. On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 245-251, 2011.
- ¹¹¹ LI, R. et al. Multiwalled carbon nanotubes modified with 2-aminobenzothiazole modified for uniquely selective solid-phase extraction and determination of Pb(II) ion in water samples. **Microchimica Acta**. v. 172, n. 3-4, p. 269-276, 2011.
- ¹¹² CUI, Y. et al. Solid-phase extraction of lead(II) ions using multiwalled carbon nanotubes grafted with tris (2-aminoethyl) amine. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 1-2, p. 107-113, 2011.
- ¹¹³ BARBOSA, A. F. et al. Solid-phase extraction system for Pb(II) ions enrichment based on multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1512-1519, 2007.
- ¹¹⁴ HU, Z.-J. et al. Optimization of ethylenediamine-grafted multiwalled carbon nanotubes for solid-phase extraction of lead cations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 4, p. 1237-1244, 2012.

-
- ¹¹⁵ TORKIAN, L. et al. A simple, rapid and sensitive method based on modified multiwalled carbon nanotube for preconcentration and determination of lead ions in aqueous media in natural pHs. **Arabian Journal of Chemistry**, Artigo aceito para publicação. doi:10.1016/j.arabjc.2014.10.041. 2014.
- ¹¹⁶ TARIGH, G. D. SHEMIRANI, F. Magnetic multi-wall carbon nanotube nanocomposite as an adsorbent for preconcentration and determination of lead (II) and manganese (II) in various matrices. **Talanta**, v. 115, p. 744–750, 2013.
- ¹¹⁷ YUAN, C-G. et al. Separation and preconcentration of palladium using modified multi-walled carbon nanotubes without chelating agent. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 3-4, p. 361-367, 2011.
- ¹¹⁸ AFZALI, D. et al. Preconcentration procedure trace amounts of palladium using modified multiwalled carbon nanotubes sorbent prior to flame atomic absorption spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 461–466, 2012.
- ¹¹⁹ GHASEMINEZHAD, S.; AFZALI, D.; TAHER, M. A. Flame atomic absorption spectrometry for the determination of trace amount of rhodium after separation and preconcentration onto modified multiwalled carbon nanotubes as a new solid sorbent. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 168-172, 2009.
- ¹²⁰ PACHECO, P. H. et al. L- Tyrosine immobilized on multiwalled carbon nanotubes: A new substrate for thallium separation and speciation using stabilized temperature platform furnace-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 36-41, 2009.
- ¹²¹ MUÑOZ, J.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. Speciation of Organometallic Compounds in Environmental Samples by Gas Chromatography after Flow Preconcentration on Fullerenes and Nanotubes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 16, p. 5389–5395, 2005.
- ¹²² GIL, R. A. et al. Application of multi-walled carbon nanotubes as substrate for the on-line preconcentration, speciation and determination of vanadium by ETAAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, n. 10, p. 1290-1295, 2007.
- ¹²³ TAJIK, S.; TAHER, M. A. A new sorbent of modified MWCNTs for column preconcentration of ultra trace amounts of zinc in biological and water samples. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 57-64, 2011.
- ¹²⁴ WALLEES, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZUN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 85-92, 2004.
- ¹²⁵ CHRISTIAENS, B. et al. Fully automated method for the liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, n. 1-2, p. 105-110, 2004.

-
- ¹²⁶ MULLETT, W. M. et al. Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 297-306, 2004.
- ¹²⁷ RBEIDA, O. et al. Fully automated LC method for the determination of sotalol in human plasma using restricted access material with cation exchange properties for sample clean-up. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 829-838, 2003.
- ¹²⁸ BAEYENS, W. R. G. et al. Application of an alkyl-diol silica precolumn in a column-switching system for the determination of meloxicam in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 839-846, 2003.
- ¹²⁹ RBEIDA, O. et al. Development and validation of a fully automated LC method for the determination of cloxacillin in human plasma using anion exchange restricted access material for sample clean-up. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 961-968, 2005.
- ¹³⁰ HUCLOVA, J. et al. Sequential injection extraction based on restricted access material for determination of furosemide in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, n. 1-2, p. 245-251, 2005.
- ¹³¹ VINTILOIU, A. et al. Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 2, p. 150-157, 2005.
- ¹³² EGLE, H. et al. Fast, fully automated analysis of voriconazole from serum by LC-LC-ESI-MS-MS with parallel column-switching technique. **Journal of Chromatography B**, v. 814, n. 2, p. 361-367, 2005.
- ¹³³ LAMBERT, J. P. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1-2, p. 43-49, 2005.
- ¹³⁴ BRUNETTO, R. et al. High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica (ADS) precolumn. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 4, p. 534-538, 2003.
- ¹³⁵ RBEIDA, O. et al. Integrated on-line sample clean-up using cation exchange restricted access sorbent for the LC determination of atropine in human plasma coupled to UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 947-954, 2005.
- ¹³⁶ BAEYENS, W. et al. Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1-2, p. 153-161, 2000.
- ¹³⁷ MUSTEATA, F. M.; WALLEES, M.; PAWLISZYN, J. Fast assay of angiotensin 1 from whole blood by cation-exchange restricted-access solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1-2, p. 231-237, 2005.

-
- ¹³⁸ WALLEES, M. et al. Approaches for coupling solid-phase microextraction to nanospray. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 197-205, 2005.
- ¹³⁹ WILLEMSSEN, O.; MACHTEJEVAS, E.; UNGER, K. K. Enrichment of proteinaceous materials on a strong cation-exchange diol silica restricted access material: protein-protein displacement and interaction effects. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 209-216, 2004.
- ¹⁴⁰ CHIAP, P. et al. Automated method for the determination of a new matrix metalloproteinase inhibitor in ovine plasma and serum by coupling of restricted access material for on-line sample clean-up to liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 1, p. 109-117, 2005.
- ¹⁴¹ GUSTAVSSON, P. E. et al. Purification of plasmid DNA with a new type of anion-exchange beads having a non-charged surface. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1-2, p. 131-140, 2004.
- ¹⁴² PREUSS, R.; ANGERER, J. Simultaneous determination of 1- and 2-naphthol in human urine using on-line clean-up column-switching liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 307-316, 2004.
- ¹⁴³ AMINI, N.; CRESCENZI, C. Feasibility of an on-line restricted access material/liquid chromatography/tandem mass spectrometry method in the rapid and sensitive determination of organophosphorus triesters in human blood plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 795, n. 2, p. 245-256, 2003.
- ¹⁴⁴ PREUSS, R.; KOCH, H. M.; ANGERER, J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 816, n. 1-2, p. 269-280, 2005.
- ¹⁴⁵ ALDA, M. J. L. et al. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 503-526, 2003.
- ¹⁴⁶ HOGENDOORN, E.; ZONEN, P. V. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1-2, p. 435-453, 2000.
- ¹⁴⁷ TAKINO, M.; DAISHIMA, S.; NAKAHARA, T. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 17, p. 1965-1972, 2003.
- ¹⁴⁸ EMARA, S. et al. Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure. **Journal of Liquid Chromatography Related Technologies**, v. 22, n. 8, p. 1235-1246, 1999.

-
- ¹⁴⁹ BELLAGAMBA, F. et al. High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique. **Journal of Chromatography A**, v. 791, n. 1-2, p. 79-84, 1997.
- ¹⁵⁰ RUŽIČKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytical Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145–157, 1975.
- ¹⁵¹ FANG, Z. **Flow injection Separation and preconcentration**, Nova York: VHC, 1993.
- ¹⁵² FERREIRA, S. L. C. et al. Application of factorial designs and Doehlert matrix in optimization of experimental variables associated with the preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1939–1950, 2002.
- ¹⁵³ JITMANEE, K.; OSHIMA, M.; MOTOMIZU, S. Speciation of arsenic(III) and arsenic(V) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry coupled with preconcentration system. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 529-533, 2005.
- ¹⁵⁴ HASHEMI, P.; BOROUMAND, J.; FAT'HI, M. R. A dual column system using agarose-based adsorbents for preconcentration and speciation of chromium in water. **Talanta**, v. 64, n. 3, p. 578-583, 2004.
- ¹⁵⁵ FANG, Z. L.; XU, S.; ZHANG, S. Fundamental and practical considerations in the design of on-line column preconcentration for flow-injection atomic spectrometric systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 200, p. 35-49, 1987.
- ¹⁵⁶ HOSHINA, K. et al. Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 25, p. 4957-4962, 2009.
- ¹⁵⁷ SAMBE, H. et al. Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 16-23, 2006.
- ¹⁵⁸ FIGUEIREDO, E. C. et al. Polímero de Impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RAM-MIP-BSA). 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. **Número do registro: PI1020120153394**, data de depósito: 22/06/2012, título: "Polímero de Impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RAM-MIP-BSA)", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- ¹⁵⁹ U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: bionalytical method validation**. Rockville: Drug Information Branch, 2013. 28 p.
- ¹⁶⁰ BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE no 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

¹⁶¹ International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: text and methodology – Q2(R1). 2005. 13 p. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em 16 fev. 2015.

¹⁶² TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods**, v. 11, n. 1, p. 1-48, 2010.

¹⁶³ CHASIN, A. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n.1, p. 1-6, 1998.

¹⁶⁴ CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 127-134, 1999.

¹⁶⁵ GÁSPÁR, A.; BERNDT, H. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) — a simple method for trace element determination with microsamples in the µg/l concentration range. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 6, p. 587-597, 2000.

¹⁶⁶ MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.

¹⁶⁷ GAO, Z. et al. Investigation of factors affecting adsorption of transition metals on oxidized carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 357-365, 2009.

¹⁶⁸ VUKOVIĆ, G. D. et al. Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 1, p. 238-248, 2010.

¹⁶⁹ MUBARAK, N. M. et al. Microwave assisted multiwall carbon nanotubes enhancing Cd(II) adsorption capacity in aqueous media. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. Artigo aceito para publicação. doi:10.1016/j.jiec.2014.09.005.

¹⁷⁰ LI, Y.H. Competitive adsorption of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 41, p. 2787-2792, 2003.

¹⁷¹ TOFIGHY, M, A.; MOHAMMADI, T. Adsorption of divalent heavy metal ions from water using carbon nanotube sheets. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 140-147, 2011.

¹⁷² COVELO, E. F.; VEGA, F. A.; ANDRADE, M. L. Simultaneous sorption and desorption of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn in acid soils: I. Selectivity sequences, **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 852-861, 2007.

¹⁷³ LIMOUSIN, G. et al. Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement, **Applied Geochemistry**, v. 22, n. 1, p. 249-275, 2007.

-
- ¹⁷⁴ EMERSON, T. E. Unique features of albumin: A brief review. **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 7, p. 690-694, 1989.
- ¹⁷⁵ GOLDBERG, R. J. A theory of antibody-antigen reactions. I. Theory for reactions of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 22, p. 5715-5725, 1952.
- ¹⁷⁶ PAPP, R.; MULLETT, W. M.; KWONG, E. A method for the direct analysis of drug compounds in plasma using a single restricted access material (RAM) column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 457-464, 2004.
- ¹⁷⁷ MORAES, G. O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013.
- ¹⁷⁸ RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n.16, p. 2618-2641, 2010.
- ¹⁷⁹ KUMMROW, F. et al. Biomonitoring method for the simultaneous determination of cadmium and lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry for assessment of environmental exposure. **Talanta**, v. 75, p. 246–252, 2008.
- ¹⁸⁰ C.D. Palmer, M.E. Lewis Jr., C.M. Geraghty, F. Barbosa Jr., P.J. Parsons, Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 980–990, 2006.
- ¹⁸¹ XIANG, G. Q.; HUANG, Y.; LUO, Y. F. Solid phase extraction of trace cadmium and lead in food samples using modified peanut shell prior to determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 165 p. 237–242, 2009.
- ¹⁸² SHOKROLLAHI, A. et al. Application of cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium and zinc ions in urine, blood serum and water samples. **Quimica Nova**, v. 36, p. 368–374, 2013.
- ¹⁸³ CANCELA, S.; YEBRA, M.C. Flow-Injection Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Trace Amounts of Cadmium in Solid and Semisolid Milk Products Coupling a Continuous Ultrasound-Assisted Extraction System with the Online Preconcentration on a Chelating Aminomethylphosphoric Acid Resin. **Journal of AOAC International**, v. 89, p. 185–191, 2006.
- ¹⁸⁴ SITKO, R.; ZAWISZA, B.; MALICKA, E. Modification of carbon nanotubes for preconcentration, separation and determination of trace-metal ions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 22-31, 2012.