

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VALÉRIA MARIA PEREIRA BARBOSA

***EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO
/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DIRETA DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE SORO HUMANO
SEGUIDO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA***

ALFENAS/MG

2015

VALÉRIA MARIA PEREIRA BARBOSA

***EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO
/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DIRETA DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE SORO HUMANO
SEGUIDO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas,
como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em
Química, Área de Concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr Eduardo Costa de Figueiredo
Co-orientador: Prof. Dr Pedro Orival Luccas

ALFENAS/MG

2015

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

Barbosa, Valéria Maria Pereira

Emprego de Nanotubos de carbono de acesso restrito na extração/pré-concentração direta de chumbo em amostras de soro humano seguido de análise por espectrometria de absorção atômica. / Valéria Maria Pereira Barbosa. -- Alfenas/MG, 2015.

61 f.

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. Soro. 2. Nanotubos de carbono. 3. Chumbo. 4. Espectrometria.
5. Absorção Atômica. I. Figueiredo, Eduardo Costa. II. Título.

CDD-543.1

VALÉRIA MARIA PEREIRA BARBOSA

***EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO /PRÉ-
CONCENTRAÇÃO DIRETA DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE SORO HUMANO SEGUIDO DE
ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA***

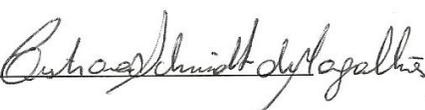
A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 23/02/2015

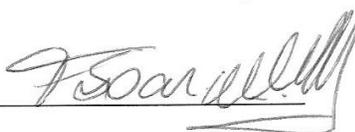
Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profa. Dra. Cristiana Schimdt de Magalhães
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Flávio Soares Silva
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Assinatura: 

Dedico ao meu amado esposo Adriano pelo amor, companheirismo e por todo apoio.

Aos meus pais pelo amor e carinho em todos os momentos e por serem meus exemplos.

A minha filha Ana Júlia que tem me ensinado que o amor não tem limites.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos me dando forças para nunca desistir.

À Universidade Federal de Alfnas pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, pela dedicação, apoio, amizade e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Pedro Orival Luccas, pelo apoio e colaboração no trabalho.

Ao doutorando Adriano Francisco Barbosa, pela colaboração e ajuda durante todo o trabalho.

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

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

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) foram sintetizados e empregados como adsorventes para a extração/pré-concentração de Pb^{2+} diretamente de amostras de soro humano. Os RACNTs desenvolvidos foram capazes de excluir 100% das proteínas das amostras além de apresentarem boa capacidade de extrair/pré-concentrar íons Pb^{2+} . As propriedades de superfície do material foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), estudos de cinética de adsorção e estudos de exclusão de proteínas. O material permitiu o desenvolvimento de um novo método para determinação direta de Pb^{2+} em amostras de soro humano, usando extração/pré-concentração em fase sólida “on-line” acoplado a técnica espectrometria de absorção atômica com nebulização térmica em tubo metálico aquecido na chama (TS-FF-AAS). Em condições experimentais otimizadas, o limite de detecção do método foi de $2,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ com fator de enriquecimento de 5,5 e a precisão inter e intra dias foram menores que 8,1% (RSD). Os ensaios de exatidão apresentaram recuperações entre 89,4 a 107,3% na extração direta de Pb^{2+} das amostras de soro humano sem qualquer tratamento prévio. O material disposto na coluna pode ser usado por mais de 200 extrações sequenciais em amostras de soro humano, sem perda de sua capacidade de exclusão de proteínas e extração de Pb^{2+} .

Palavras-chave: Preparo de amostras, soro humano, nanotubos de carbono de acesso restrito, chumbo, espectrometria de absorção atômica.

ABSTRACT

Restricted access carbon nanotubes (RACNTs) were synthesized and used as sorbent for the Pb^{2+} extraction/preconcentration directly from human blood serum samples. The RACNTs were able to exclude 100% of the protein percolated through it, as well as to extract/pre-concentrate Pb^{2+} . The surface properties of the material were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), adsorption kinetics studies and studies of excluded proteins. The material allowed the development of a novel method for direct Pb^{2+} determination in human serum samples using an “on-line” solid phase extraction system coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS). In the optimized experimental conditions, the detection limit was 2.1 mg L^{-1} with an enrichment factor of 5.5. The inter- and intra-day precisions for Pb^{2+} were less than 8.1% (RSD). The accuracy tests showed recoveries between 89.4 and 107.3% for the direct extraction of Pb^{2+} from blood serum sample, without any pretreatment. The material disposed in the column can be used for more than 200 sequential extractions in human serum samples, with no loss of protein capacity exclusion extraction and Pb^{2+} .

Keywords: Sample preparation, human serum, restricted access carbon nanotubes, lead, atomic absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo da possível estrutura dos CNTs-----	18
Figura 2 - Ilustração da oxidação dos CNTs e mecanismo de adsorção de íons metálicos-----	19
Figura 3 - Representação esquemática do sistema de pré-concentração em fluxo com RACNT para determinação de Pb^{2+} -----	34
Figura 4 - Micrografias eletrônicas de varredura dos CNTs (A) e RACNTs (B) -----	37
Figura 5 - Micrografias eletrônicas de transmissão dos CNTs (a) e RACNTs (b). Setas em azul indicam as estruturas dos CNTs e as setas em vermelho indicam a presença do recobrimento dos CNTs com BSA -----	37
Figura 6 - Espectros de energia dispersiva para CNTs (A) e RACNTs (B) Live Time 100,0 s -----	38
Figura 7 - Ensaio de exclusão de proteínas em colunas empacotadas com CNTs. e RACNTs -----	39
Figura 8 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de Pb^{2+} para CNTs e RACNTs -----	40
Figura 9 - Estudo de adsorção de íons Pb^{2+} em CNTs e RACNTs -----	41
Figura 10 - Diagrama de Pareto obtido no estudo de otimização das variáveis e sua significância para sorção de Pb^{2+} em RACNTs -----	44
Figura 11 - Efeito do pH na extração/pré-concentração de Pb^{2+} em BSA 44 mg mL ⁻¹ -----	45
Figura 12 - Estudo de exclusão das proteínas com as respostas de absorção molecular da etapa de pré-concentração/limpeza da coluna e resposta de absorção atômica e correção de fundo para determinação de Pb^{2+} por TS-FF-AAS na etapa de eluição após otimização do sistema-----	46
Figura 13 - Curva analítica (A) e respectivos registos de sinal (B) para extração/pré-concentração de Pb^{2+} em RACNTs para padrões preparados em “pool” de soro humano 50% (v/v) em tampão acetato pH 5,7. OBS: O Diagrama (B) corresponde ao registro dos sinais a partir de 1 min de cada medida não apresentando o tempo total de análise-----	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs com reagentes sólidos na extração/pré-concentração de chumbo -----	20
Tabela 2 - Resumo de algumas aplicações de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas-----	25
Tabela 3 - Parâmetros do modelo de Langmuir e Freundlich obtidos para os CNTs e RACNTs -----	41
Tabela 4 - Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial completo 2^4 utilizado na otimização do sistema de extração / pré-concentração em fluxo de Pb^{2+} com detecção por TS-FF-AAS -----	42
Tabela 5 - Planejamento fatorial completo 2^4 usado para avaliar o efeito das variáveis na extração / pré-concentração em fluxo de Pb^{2+} por RACNT -----	43
Tabela 6 - Parâmetros analíticos para extração e determinação direta de Pb^{2+} em soro humano por TS-FF-AAS -----	49
Tabela 7 - Resultados dos testes de exatidão para determinação de Pb^{2+} em amostras de soro humano -----	50
Tabela 8 - Comparação de diferentes métodos de espectrometria de absorção atômica utilizados para determinação de Pb^{2+} em fluídos biológicos -----	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE ANALITOS INORGÂNICOS	14
2.2	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE ANALITOS INORGÂNICOS	16
2.3	NANOTUBOS DE CARBONO	17
2.4	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO.....	23
2.5	CHUMBO	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	30
4.2	INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS	30
4.3	PREPARO DOS RACNTS.....	31
4.4	CARACTERIZAÇÃO RACNTS.....	32
4.5	SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO COM PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM LINHA	33
4.6	OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO SISTEMA	34
4.7	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
4.8	TRATAMENTO DOS DADOS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ADSORVENTE.....	36

5.2	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO/PRÉ- CONCENTRAÇÃO EM FLUXO.....	41
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO E APLICAÇÕES.....	46
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Aliado ao rápido desenvolvimento da ciência e tecnologia, diversos metais têm sido extensivamente utilizados em diferentes campos da indústria, agricultura, entre outros, sendo, inevitavelmente, lançados ao ambiente. Além disso, eles podem se acumular em diferentes compartimentos ambientais podendo gerar efeitos tóxicos em humanos por meio de exposição ambiental e ocupacional. Para se avaliar os efeitos dos metais no ambiente, nos ecossistemas e para a saúde dos seres humanos, se faz muitas vezes necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis e confiáveis para a determinação de teores muito baixos destes em amostras ambientais e biológicas¹.

A preparação de amostras é geralmente considerada a etapa mais crítica do processo analítico^{2,3}, tendo como finalidades a purificação da amostra e/ou pré-concentração dos analitos. Para a análise de metais, o preparo de amostras depende de fatores como o método analítico a ser utilizado, a concentração do analito, o tipo de matriz em que o analito está presente, dentre outras. Na maioria dos métodos de preparo de amostras, tem-se a dissolução da amostra, produzindo uma solução límpida que pode ocorrer por digestão em bloco digestor, queima em mufla seguido por dissolução ácida, digestão em forno de microondas aberto ou fechado, entre outros⁴.

Ao longo dos anos, a preparação de amostras sofreu avanços impulsionados por procedimentos assistidos pela técnica de microondas^{5,6,7}. Digerir uma amostra num forno de microondas tem várias vantagens sobre os métodos de dissolução em recipientes abertos, já que fornece o controle e registro da temperatura e pressão nos recipientes, ajuste da potência, pressão máxima e temperatura do forno. Além disso, o tempo de digestão do forno pode ser programado de modo que cada amostra é tratada de uma maneira reprodutível⁴. A etapa de digestão por microondas apresenta outras vantagens interessantes, além das já citadas, entre elas a maior segurança, versatilidade, adição programada das soluções⁸ e menor contaminação da amostra.

Apesar de todas as vantagens, o forno de microondas apresenta algumas limitações como, por exemplo, o fato da digestão das amostras ser conduzida com a presença de um ácido ou mistura de ácidos, o que gera um consumo maior de reagentes e a possibilidade de contaminação. Ademais, podem ocorrer perdas durante o processo de digestão quando se trabalha com elementos voláteis⁹, além do fato de ser um procedimento moroso por envolver muitas etapas, havendo assim uma maior probabilidade de erros.

Nesse sentido, visando maximizar a sensibilidade e/ou seletividade de sistemas analíticos de detecção, a literatura 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 e interferentes de matriz e os métodos de detecção. Dentre eles pode-se destacar a extração em fase sólida (SPE).

A aplicação de sorventes sólidos apresenta características interessantes 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”¹⁰.

A SPE em fluxo apresenta várias vantagens, sobre os métodos “off-line”, como maior precisão; baixo consumo de amostras e reagentes; capacidade de reutilização das colunas; menor geração de resíduos; entre outros. Dentre os vários reagentes sólidos apresentados nos últimos anos, os nanotubos de carbono (CNTs), de camadas simples ou múltiplas, vêm ganhando atenção na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos e orgânicos¹¹. A modificação de superfície dos CNTs pode proporcionar sorventes promissores no desenvolvimento de novos métodos analíticos mais sensíveis, seletivos e que necessitem de diminutas etapas prévias de preparo de amostra.

Para a análise de analitos orgânicos, as técnicas de injeção direta de fluidos biológicos com uso de fases estacionárias do tipo RAM (Material de Acesso Restrito) têm se destacado⁴. A característica fundamental dos RAMs é que os mesmos são capazes de reter compostos de baixo peso molecular, e excluir macromoléculas como proteínas. Esses materiais permitem a injeção direta de fluidos proteicos como soro humano, sem qualquer etapa prévia de preparo de amostra, além de apresentar alta resistência física com um bom desempenho em termos de capacidade de retenção, eficiência e reprodutibilidade.

O uso de RAM foi relatado pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa para a extração direta de Cd^{2+} em amostras de soro humano. Neste trabalho, os CNTs foram oxidados e, em seguida, revestidos com albumina de soro bovino, o que possibilitou a exclusão de 100% das proteínas de amostras de soro humano enquanto íons Cd^{2+} foram extraídos/pré-concentrados em um sistema de análise em fluxo com detecção por TS-FF-AAS. Assim, julga-se que o uso de nanotubos de carbono de acesso restrito seja de grande potencial para análise direta de Pb^{2+} em matrizes proteicas, minimizando o preparo de amostras, geração de resíduos, consumo de reagentes e, conseqüentemente, aumentando a frequência de análise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão apresenta uma síntese da bibliografia para o preparo de amostras para determinação de chumbo em amostras biológicas com determinação por espectrometria de absorção atômica, a aplicação dos CNTs na pré-concentração de Pb^{2+} e as potencialidades dos materiais de acesso restrito para extração direta de Pb^{2+} de amostras biológicas.

2.1 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE ANALITOS INORGÂNICOS

A determinação de metais em níveis traços e ultra-traços em amostras complexas e em materiais de alta pureza é muito importante na prevenção de doenças, proteção ambiental, etc. No entanto a baixa concentração dos analitos, assim como as interferências de matriz, tornam a determinação destes metais limitada, exigindo que os métodos analíticos sejam cada vez mais seletivos e com melhor detectabilidade.

Um processo analítico geralmente envolve quatro etapas principais: preparação de amostras, separação analítica, detecção, e tratamento dos dados. A preparação da amostra é geralmente considerada a etapa limitante do processo^{2,3}, e tem como finalidades a purificação da amostra e/ou pré-concentração dos analitos. Ademais, é considerada uma etapa crítica na análise devido à alta possibilidade de erros, sendo a etapa de maior custo. Mesmo com avanços recentes, o preparo de amostras ainda requer maiores avanços para alcançar os mesmos padrões de todas as técnicas instrumentais, necessários para determinação precisa e exata dos analitos^{9,12}.

A preparação de amostras é o passo mais moroso da análise, especialmente quando comparado com o tempo de determinação, uma vez que a instrumentação analítica utilizada está cada vez mais desenvolvida¹³.

Para a determinação de metais podem ser utilizadas várias técnicas analíticas, tais como gravimetria, métodos espectroscópicos ou cromatográficos, entre outros. Assim a maneira de preparar a amostra depende do tipo de amostra e das exigências da análise¹⁴.

O método de preparação de amostras para a análise de metais depende de fatores como: técnica a ser utilizada; concentração das substâncias a serem analisadas e do tipo de matriz em

que o analito está presente. Na maioria desses métodos, tem-se a mineralização da amostra, produzindo uma solução límpida que pode ocorrer por digestão em bloco digestor, queima em mufla seguido por dissolução ácida, digestão em forno de microondas aberto ou fechado, entre outros⁴. O método de digestão deve ser selecionado para se adequar ao tipo de amostra, aos metais a serem determinados, e, por fim, ao método analítico. A maioria dos métodos analíticos requer uma amostra líquida. Muitas matrizes podem ser digeridas por aquecimento numa solução de ácido forte oxidante, outras podem ser tratadas somente através da extração de metais, etc⁴.

Para a determinação de metais em níveis traços, utilizam-se reagentes muito agressivos para a destruição da matriz requerendo cuidados constantes para não contaminar a amostra e prevenir a perda do analito⁴.

A destruição total da matriz assegura a disponibilidade total dos analitos para a análise. No entanto a morosidade do processo é um dos pontos mais críticos.

Ao longo dos anos, a preparação de amostras sofreu avanços impulsionados por procedimentos assistidos pela técnica de microondas^{5,6,7}. Uma vez que digerir uma amostra em um forno de microondas apresenta várias vantagens sobre os métodos de dissolução em recipientes abertos já que fornece o controle e registro da pressão e temperatura nos recipientes, ajuste da potência, temperatura do forno e pressão máxima. O tempo de digestão e a potência do forno podem ser programados de modo que cada amostra seja tratada de uma maneira reprodutível⁴.

A técnica de microondas pode ser utilizada em diferentes estágios da análise: secagem, calcinação e dissolução. Dentre as vantagens apresentadas pela etapa de digestão pode-se destacar: maior segurança, versatilidade, adição programada das soluções e menor contaminação⁸.

Mesmo apresentando todas essas vantagens, o forno de microondas apresenta algumas limitações, uma vez que a digestão das amostras é conduzida com a presença de um ácido ou mistura de ácidos gerando um consumo maior de reagentes e possibilidades de contaminação. Além disso, podem ocorrer perdas durante o processo de digestão quando se trabalha com elementos voláteis¹⁵. Por ser um procedimento em que envolve muitas etapas, há uma maior probabilidade de ocorrer erros.

Outra desvantagem se deve ao fato da digestão ocorrer em sistemas fechados, pois os frascos devem ser resfriados antes de sua abertura, sendo esse um processo bastante demorado. Há também problemas relativos aos altos custos de aquisição e manutenção destes equipamentos¹⁵.

Deste modo, nota-se que um sistema de análise onde não requer qualquer etapa de preparo de amostra é promissor, uma vez que evita erros, melhora exatidão e precisão, proporciona uma maior velocidade analítica, diminui custos operacionais e de aquisição de equipamentos, entre outros.

2.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE ANALITOS INORGÂNICOS

A extração em fase sólida (SPE) envolve a sorção de analitos selecionados entre um gás, fluído ou fase líquida e uma fase sólida¹⁶. O método SPE consiste de etapas sucessivas incluindo: o condicionamento do sorvente sólido com a percolação de solução específica, passagem da amostra, lavagem do sorvente sólido com um solvente para eliminar os componentes da matriz que foram retidos (sem eluir os analitos) e, finalmente, eluição dos analitos de interesse, empregando um solvente apropriado. A distribuição do analito entre uma solução aquosa e o sorvente é baseada em mecanismos de adsorção, troca iônica, quelação de íons para formação de par iônico ou de complexos e outras reações químicas na superfície ou no interior dos sorventes sólidos^{17, 18}.

A SPE, além de separar o analito da matriz, proporciona, em muitos casos, a pré-concentração dos analitos de interesse. A pré-concentração é um dos diferentes processos que proporciona o aumento da razão analito/matriz, assim como proporciona melhora no limite de detecção analítico, aumenta a sensibilidade em várias ordens de magnitude, aumenta o grau de precisão dos resultados e melhora a seletividade¹⁹. As principais técnicas de pré-concentração são extração em fase sólida, co-precipitação, extração líquido-líquido, filtração por membranas e extração por ponto nuvem^{20, 21, 22, 23}.

Atualmente, muitos pesquisadores tem dado atenção a técnica de extração com sorventes sólidos, devido às vantagens como o alto fator de enriquecimento, alta recuperação, simplicidade, altos valores de frequência analítica e a capacidade de combinação de diferentes técnicas de detecção “on-line” ou “off-line”¹⁰. A SPE em fluxo apresenta várias vantagens, sobre os métodos “off-line”, como: maior precisão; baixo consumo de amostras e reagentes; reutilização; menor geração de resíduos; entre outras.

No estudo com extração em fase sólida, o uso adequado do sorvente é o fator crítico para obter um alto fator de enriquecimento²⁴. Eles são capazes de adsorver íons metálicos e/ou

complexos de íons metálicos ou podem servir como suporte na incorporação de agentes quelantes.

Os sorventes sólidos podem ser de origem natural²⁵ (ácidos húmicos, vermicompostos, casca de arroz, *saccharomyces cerevisiae*, bactéria *E. coli*, etc) ou de origem sintética^{26, 27, 28} (resinas trocadoras de íons, carvão ativado, sílica modificada, resinas absorventes tipo Amberlite IRA-904, PTFE, espuma de poliuretano, polímeros impressos para íons e mais recentemente as nanopartículas). Contudo, os materiais sintéticos são mais utilizados, já que possuem maior estabilidade química e mecânica.

Embora a SPE apresente várias vantagens para extração de analitos inorgânicos, essa técnica está limitada a aplicação direta em matrizes mais simples como amostras de água e amostras orgânicas mineralizadas e condicionadas. Deste modo, os métodos analíticos para analitos inorgânicos envolvendo matrizes complexas como, soro e plasma de sangue total, leite, etc., demandam etapas morosas de preparo de amostras, devido principalmente à presença de macromoléculas indesejáveis como proteínas, que se ligam aos sorventes causando imprecisão e inexatidão dos resultados, além de entupimento das colunas.

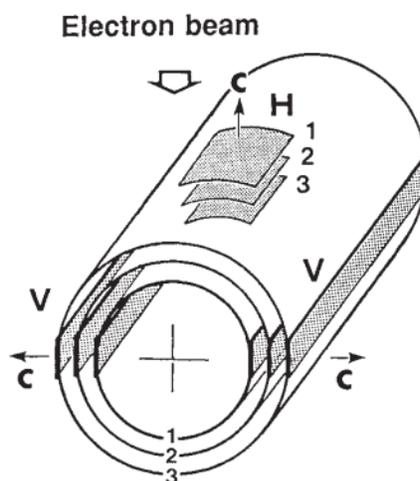
Dentre os vários sorventes sólidos apresentados nos últimos anos, os nanotubos de carbono (CNTs), de camadas simples ou múltiplas, vêm ganhando atenção na extração/pré-concentração de analitos inorgânicos e orgânicos²⁹. Observa-se que sua aplicação foi bem explorada para diversos analitos³⁰ e há tendência para aplicação em amostras mais complexas, uma vez que esses sorventes apresentam elevados fatores de pré-concentração para vários analitos, dentre outras vantagens.

2.3 NANOTUBOS DE CARBONO

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono em 1991, eles têm sido utilizados como substratos de sorção em SPE para a pré-concentração de espécies de metais a partir de diferentes matrizes³¹. Suas aplicações incluem campos da 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 materiais²⁹ e foram produzidos pela primeira vez por Sumio Iijima³² em 1991. Na Figura 1 está apresentado o modelo da possível estrutura dos CNTs. Em

1993 os mesmos autores produziram os CNTs com parede simples. 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, diâmetro de 4 a 30 nm e 1 μm de comprimento.

Figura 1 - Modelo da possível estrutura dos CNTs



Fonte: IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, p. 56-58, 1991.

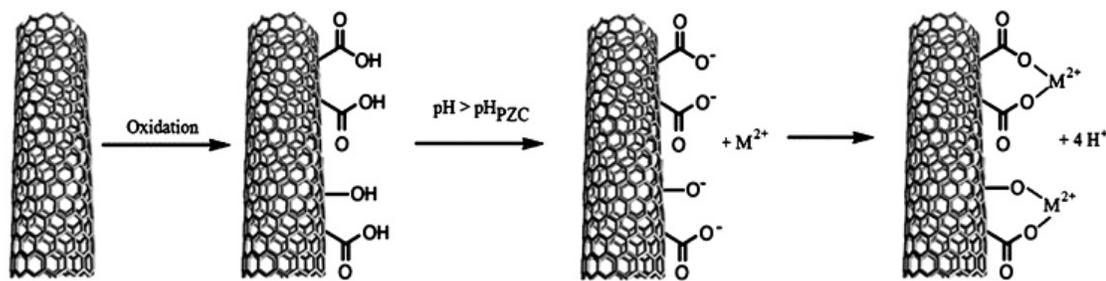
Dentre as propriedades dos CNTs favoráveis às técnicas de SPE, citam-se a elevada estabilidade química e física e, principalmente, a elevada área superficial, condição essa de extrema importância em processos adsorptivos³³.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos métodos analíticos (“off-line” e “on-line”) desenvolvidos, usando CNTs como reagentes sólidos para separação e/ou pré-concentração de chumbo. 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 adsorptiva.

Para mudar a seletividade dos CNTs utilizam-se técnicas de funcionalização por interações não covalentes, as quais envolvem somente adsorção física sem ligação química, e interações covalentes³⁴. Para metais a modificação mais comum ocorre principalmente pelo uso de agentes oxidantes como HNO_3 , H_2O_2 , NaOCl , KMnO_4 dentre outros, que interagem com a estrutura dos nanotubos de carbono promovendo abertura das folhas de nanotubos, fratura ou formação de defeitos na estrutura tubular. Assim, o processo de oxidação promove a dispersão dos nanotubos de carbono além de incluir sobre a superfície dos mesmos grupos funcionais como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, ou $\text{C}=\text{O}$ que permitem a formação de sítios de ligação capazes de reter

íons metálicos³⁵ como apresentado na Figura 2. Para Li e colaboradores³⁶, estes grupos funcionais causam um aumento de carga negativa na superfície dos CNTs, aumentando a capacidade de troca iônica entre a superfície e os íons metálicos, aumentando assim a capacidade adsortiva.

Figura 2 - Ilustração da oxidação dos CNTs e mecanismo de adsorção de íons metálicos.



Fonte: LATORRE, C. H. et al. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 749, p. 16-35, 2012.

Os CNTs também 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 espaço. A combinação de duas ou mais interações semelhantes ou diferentes aumentam a estabilidade e a seletividade desses sorventes.

Embora algumas aplicações dos CNTs na extração de analitos inorgânicos em análise por injeção em fluxo tenham sido publicadas nos últimos anos, esses materiais ainda apresentam-se promissores no desenvolvimento de metodologias analíticas. Ademais, nota-se uma tendência nos últimos anos da aplicação dos CNTs como extratores sólidos para aplicação em amostras mais complexas e com minimização de etapas prévias de tratamento de amostra. Assim, as modificações de superfície dos CNTs podem proporcionar sorventes mais versáteis no desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis, seletivos e que necessitem de diminutas etapas prévias de preparo de amostra.

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs como reagentes sólidos na extração/pré-concentração de chumbo. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores²⁹, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores³⁰ e pelos autores da dissertação.

(continua)					
Analito	Matriz	Tipo de CNTs / características	Metodologia	LODs	Referência
Cd (II), Pb (II), Ni (II)	CRMs (Pepperbush e folhas de chá), água de rio e de poço	PAN/o-WCNTs o.d.: –	FAAS	0.04–0.32 $\mu\text{g.L}^{-1}$	37
Cd (II), Co (II), Cu (II), Cr (VI), Pb (II), V (V), As (III).	CRM (concha), peixe, camarão, concha.	IDA-MWCNTs diâmetro: 20–30 nm	ICP-MS	0.4–3.4 ng.L^{-1}	38
Cd(II), Co(II), Ni(II),Pb(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) (como Complexo 8-hydroxiquinoline)	CRMs (líquen, fígado bovino, sedimento de rio), produtos farmacêuticos e água	MWCNTs o.d.: 10–15 nm	FAAS	1.0–5.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	39
Cd (II), Pb (II)	CRM (cabelo humano), água de rio e de reservatório	MnO ₂ -WCNTs o.d.: –	ETAAS	0.15 e 0.44 $\mu\text{g.L}^{-1}$	40
Cd (II), Pb (II)	Peixes, sedimentos	P ₂ AT/MWCNTs o.d.:10–20 nm	FAAS	0.3 and 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	41
Co (II), Cu (II), Pb (II)	CRM (mexilhão), água natural	o-SWCNTs o.d.: –	ICP-MS	1.2–39 ng.L^{-1}	42
Co (II), Cu (II), Ni (II), Pb(II), Fe (III), Mn (II)	CRM (sedimento de rio)	DWCNTs o.d.: 5 nm	FAAS	0.5–6.9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	43
Cu (II), Fe (III), Mn (II), Pb (II)	CRM (sedimentos de rio, água de lago), água de torneira e mineral, Syzygium singiber officinale e farinha de arroz	MWCNTs o.d.: –	FAAS	3.5–8.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	44
Cu (II), Fe (III), Pb (II)	Água de rio	PIDA-MWCNTs; Diameter: 8 nm	ICP-OES	0.15–0.26 $\mu\text{g.L}^{-1}$	45

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs como reagentes sólidos na extração/pré-concentração de chumbo. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores²⁹, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores³⁰ e pelos autores da dissertação.

(continuação)					
Analito	Matriz	Tipo de CNTs / características	Metodologia	LODs	Referência
Cr (III), Fe (III), Pb (II)	CRM (sedimentos de rio), folhas de pêra de bálsamo, rio de água	EDA-MWCNTs: o.d.: 15–65 nm	ICP-OES	0.19–0.33 $\mu\text{g.L}^{-1}$	46
Ni (II), Pb (II)	CRMs (lama municipal, sedimentos de lagos)	MWCNTs; o -MWCNTs; L-Ala-MWCNTs: o.d.: –	ETAAS	10–30 ng.L^{-1}	47
Pb (II)	CRMs (sedimentos de rio), água de rio, torneira e lago.	ABTZ-MWCNTs: o.d.: 15–65 nm	ICP-OES	0.27 $\mu\text{g.L}^{-1}$	48
Pb (II)	Água de rio	TAA-MWCNTs: Diameter: 8 nm	ICP-OES	0.32 $\mu\text{g.L}^{-1}$	49
Pb (II)	Água de rio	EDA-MWCNTs: Diameter: 15 μm	AAS	0.30 $\mu\text{g L}^{-1}$	50
Trimetilchumbo (I), dimetilchumbo (II), trietilchumbo (I), dietilchumbo(II), metil-mercúrio (I), etilmercúrio (I), Hg (II), n-butyl estanho(III), n-dibutyl estanho (II), tri-n-butyl estanho (I) e estanho (IV)	Água e sedimento costeiro	MWCNTs: o.d.: 2–15 nm, comprimento : 1–10 μm	GC-MS	1–3 ng.L^{-1}	51
Cd(II), Pb(II), Cu (II), Zn(II) and MnO_4^-	Água de torneira, de reservatório e água corrente.	MWCNTs: o.d.: 10 – 100nm comprimento : 5–15 μm , 1–2 μm	FAAS	8.7–378 .L^{-1}	52

Tabela 1 - Recentes aplicações de CNTs como reagentes sólidos na extração/pré-concentração de chumbo. Esta revisão apresenta dados revisados pelos autores L.M. Ravelo-Pérez e colaboradores²⁹, e A.V. Herrera-Herrera e colaboradores³⁰ e pelos autores da dissertação.

Analito	Matriz	Tipo de CNTs / características	Metodologia	LODs	(conclusão) Referência
Pb(II)	Água de torneira, mineral, mar, soro, alho, e ginkgo Biloba.	MWCNTs: i.d.: 10–40 nm, comp.5–20µm	FAAS	2.6µg.L ⁻¹	53
Cu(II), Cd(II), Pb(II),Zn(II),Ni (II) e Co(II) como complexo de ditiocarbamato pirrolidina	Água de torneira, fonte, água do mar, molho de tomate, conservas de peixe, folhas de maçã e grão de bico	MWCNTs: o.d.: 30–50 nm, i.d.: 5–15 nm, comprimento : 0.5–200 µm	FAAS	0.30–0.60 µg.L ⁻¹	54
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: o.d.: 30–50 nm, i.d.: 5–15 nm, length: 0.5–200 µm	FAAS	0.24–2.60 µg.L ⁻¹	55
Cd(II),Cr(III), Pb(II), Zn(II), Cu(II) e Mn(II)	Água corrente, de reservatório e de torneira.	MWCNTs: o.d.: 10–30 nm, length 5–15µm	FAAS	9–378 ng.L ⁻¹	56
Cr(III), Fe(III) e Pb(II)	Sedimento de rio, folhas de bálsamo, pêra e água.	MWCNTs: o.d.: 15–65 nm, length: 10–50 µm	ICP-OES	0.19–0.33µg.L ⁻¹	46
Cu (II),Co (II), Ni(II) e Pb(II) como complexos de o-cresolftalein	Sedimentos de rio, água de torneira, fonte, mar e mineral.	MWCNTs: o.d.: 20–40 nm, i.d.: 5–10 nm, length: 0.5–50 µm	FAAS	1.64–5.68 µg.L ⁻¹	57

Fonte: Do autor

Notas: ----: dados não indicados no trabalho.

2.4 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

A demanda de análises nos laboratórios tem crescido em proporções superiores ao desenvolvimento de produtos, uma vez que cada produto necessita de análise para o controle de matéria prima, controle de processos produtivos, controle de qualidade, avaliação de sistemas de tratamentos de efluentes, avaliação ambiental, controle de exposição ocupacional, entre outros. Nesse sentido, os procedimentos necessários para o preparo das amostras devem ser rápidos e convenientes, minimizando perdas do analito e custos de análise⁵⁸. Para obter tais características, técnicas de injeção direta de amostras têm sido exploradas. Do mais, as técnicas de injeção direta de amostras eliminam erros humanos de manipulação, evitam o manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumentam a frequência de análise⁵⁹.

Para a análise de analitos orgânicos, as técnicas de injeção direta com uso de fases estacionárias do tipo RAM (do inglês *restricted-access material*) têm se destacado. Estes materiais combinam os princípios da cromatografia de exclusão e da cromatografia de fase reversa, onde, sua superfície hidrofílica impede a adsorção de macromoléculas da matriz biológica na fase estacionária e suas propriedades hidrofóbicas (em poros internos) são responsáveis pela retenção das moléculas⁶⁰.

A característica fundamental dos RAMs é que os mesmos apresentam seletividade através de mecanismos químicos ou físicos, onde somente determinados compostos sofrem retenção no interior dos poros. Uma das vantagens dos RAMs é que eles podem ser usados para determinar compostos orgânicos em amostras bastante complexas como plasma, soro, sem a remoção prévia das proteínas⁶¹.

Assim macromoléculas são eluídas com a fase móvel de limpeza, evitando a adsorção de proteínas⁶², enquanto que os analitos são mantidos por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas no interior dos poros hidrofóbicos. Macromoléculas podem ser excluídas por uma barreira física, devido ao diâmetro do poro, ou por uma barreira química. No caso da barreira química, grupos funcionais hidrofílicos são ligados covalentemente à superfície da fase estacionária, se portando como uma barreira que impede a ligação de macromoléculas por meio de repulsão eletrostática.

Uma grande vantagem desses materiais é que eles apresentam 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 precisa⁶³.

Em 1985, Hagestam e Pinkerton publicaram o primeiro artigo sobre RAM. Desde então, o número de trabalhos publicados sobre RAM e a quantidade de tipos desses materiais cresceu exponencialmente. Existem cinco tipos básicos de RAM, divididos por grupos de acordo com a natureza da barreira, e a estrutura da superfície do sorvente: O material misto; a superfície interna de fase reversa; as fases hidrofóbicas protegidas; as superfícies semipermeáveis e os materiais poliméricos⁶⁴.

No caso do material misto, ambas as superfícies (externa e interna) destes materiais apresentam propriedades idênticas, que são fornecidas pela ligação covalente de dois grupos funcionais diferentes, ou por um grupo funcional com duas possíveis interações. Os materiais de superfície interna de fase reversa são caracterizados por 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 a superfície interna do sorvente. Os RAMs de fases hidrofóbicas protegidas apresentam uma fase estacionária com uma barreira química impedindo as macromoléculas de ter acesso aos grupos funcionais. Os RAMs de superfícies semipermeáveis apresentam uma barreira química típica de polímero hidrofílico, excluindo o acesso das macromoléculas à superfície. A superfície externa repele as moléculas grandes, enquanto que a superfície interna retém os analitos que penetram através da camada do polímero. Colunas de enchimento com materiais poliméricos são usadas para pré-concentração de analitos hidrofóbicos e hidrofílicos e para a remoção de macromoléculas⁶⁴.

Na Tabela 2 são apresentados alguns trabalhos publicados com a aplicação de RAM na injeção direta de amostras biológicas para determinação de diferentes analitos orgânicos⁶⁴.

Recentemente, relatamos pela primeira vez a aplicação de materiais de acesso restrito para extração direta de Cd^{2+} em amostras de soro humano⁶⁵. Neste trabalho, os CNTs oxidados foram revestidos com albumina de soro bovino o que possibilitou a exclusão de 100% das proteínas de amostras de soro humano enquanto íons Cd^{2+} foram extraídos/pré-concentrados em um sistema de análise em fluxo com detecção por TS-FF-AAS. Considerando que as várias técnicas de extração/pré-concentração de Pb^{2+} usando CNTs (resumidas na Tabela 1) apresentaram elevada detectabilidade, elevados fatores de enriquecimento, etc., julga-se que o uso de nanotubos de carbono de acesso restrito sejam de grande potencial para análise direta de Pb^{2+} em matrizes proteicas, minimizando o preparo de amostras, geração de resíduos, consumo de reagentes e conseqüentemente, aumentando a frequência de análise.

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, LiChrospher 60 XDS (25x 4mm), 25 µm, Merck	66
	Plasma humano	Acetato de ciproterona	LiChrospher RP-4 ADS (25x2mm), 25µm, Merck	67
	Urina humana Plasma humano	Verapamil e metabolitos	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25 µm, Merck	68
	Plasma humano	Sotalol	LiChrospher 60 XDS (25x4mm), 25 µm, Merck	69
	Plasma humano	Meloxicam	LiChrospher RP-18 ADS (25x 4mm), 25µm, Merck	70
	Plasma humano	Cloxacilina	LiChrospher 60 XDS (DEAE/diol) (25x4 mm), 25µm, Merck	71
	Soro humano	Furosemida	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	72
	Plasma humano	Rofecoxib	LiChrospher 60 RP-18 ADS (25x4 mm), 40–63µm, Merck	73
	Soro humano	Voriconazol	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	74
	Plasma humano	Cafeína e matabolitos	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	75
Plasma humano	Cocaína e benzoilecgonina	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	76	

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

Aplicação	Matriz	Analitos	Material	Referências
Determinação de antídotos	Plasma humano	Atropina	LiChrospher 60 XDS (SO ₃ /diol) (25x4 mm), 25µm, Merck	77
Análise veterinária	Plasma de cavalo	Enantiômeros de cetoprofeno	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	78
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	79
		Angiotensina 2	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	
	Sangue humano	Peptídeos	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck, LiChrospher 60 XDS (25x4mm), 25µm, Merck	80
	Plasma humano	Proteínas enzimáticas	SCX-RAM (SO ₃ /diol) (25x2mm)	81
	Urina humana	Drogas	and (25x 4 mm), 25µm (LSP MDA, Merck)	
Desenvolvimento de novas drogas	Soro de ovelha Plasma de ovelha	Metaloproteínas	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	82
Purificação de DNA plasmídeo	Célula lisa	Gene	Q-Sephacryl S-500 HR,	83
Monitoramento ambiental	Urina humana	1,2 - naftol	LiChrospher RP-8 ADS (25x 4mm), 25µm, Merck	84
	Plasma humano	Triésteres organofosforados	LiChrospher RP-18 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	85
	Urina humana	Cinco principais metabolitos da di-(2- etilhexil) ftalato (DEHP)	LiChrospher RP-8 ADS (25x4mm), 25µm, Merck	86
	Água potável, de superfície de rio e sedimentos	Hormônios esteróides sexuais	LiChrospher RP-4, RP-8; ADS (25x4mm), 25µm, Merck	87

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

				(conclusão)
Aplicação	Matriz	Analitos	Material	Referências
Análise de alimentos	Frutas	Pesticidas	Hisep SHP (50 · 4.6 mm), 5µm, Supelco SPS-5PM-S5-100-C18 (50 x4.6 mm), 5µm, Regis Tech	88
	Água do solo	Herbicidas		
	Suco de maçã	Patulina		89
	Gema de ovo	Colesterol	BioTrap C18, protein-coated RP-18 pre-column, ChromTech	90
	Leite	Poliaminas	LiChrosorb C18 (50x4.6 mm), 10µm, Agilent	91

Fonte: do autor

2.5 CHUMBO

Alguns elementos que se encontram na natureza possuem papel metabólico na vida dos organismos. Os elementos químicos podem ser classificados em macro, micro, ou traços de acordo com sua abundância, e representam respectivamente 93%, 5% e 1% da massa corporal.

Os elementos que estão presentes em amostras de alimentos, ambientais ou biológicas, nas concentrações de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ são considerados elementos traço e quando encontrados em sub-frações destas concentrações são considerados ultra-traços⁹².

Os elementos traço podem ser subdivididos em elementos essenciais (V, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Se, F, I), tóxicos (Cd, Cr, Hg, Pb, As), com função biológica não conhecida (B, Al, Ga, In, Tl, Ge, Be, Rb, Cs, Te, Po, Br, entre outros), e ministrados como medicamento para tratamento de saúde (Li, Y, Pt, Ag, Au, Sb, Bi)⁹³.

O chumbo é um metal tóxico para os seres humanos e para outros seres vivos. A espécie Pb^{2+} é a mais frequentemente encontrada na natureza⁹⁴, pois somente dois elétrons ionizam-se facilmente. As fontes mais comuns deste metal no ambiente são pigmentos à base de chumbo em tintas, agrotóxicos, baterias descartadas, instalações hidráulicas, entre outros.

A absorção do chumbo é influenciada pela forma química, pela solubilidade de seus compostos, pelo tamanho da partícula, pela rota de exposição e pelas variações patológicas e fisiológicas.

O chumbo absorvido é distribuído entre o plasma e os eritrócitos. Para avaliação da exposição, a determinação do chumbo no plasma é uma medida mais exata do que no sangue.

A distribuição do chumbo entre os órgãos depende do gradiente de concentração e da afinidade com o tecido específico. Os níveis mais altos têm sido encontrados na aorta, rins, pulmões, fígado e cérebro.⁹⁶ A meia-vida do chumbo no sangue e tecidos moles está na faixa de 36-40 dias para adultos. O chumbo segue o caminho metabólico do cálcio durante sua distribuição e acumula-se nos ossos e dentes. Do conteúdo total de chumbo no organismo, 90% está contido nos ossos, onde a meia-vida é de mais de 10 anos. A concentração de chumbo no sangue do recém-nascido é semelhante à da mãe, uma vez que o metal transpõe rapidamente a barreira placentária.⁹⁵

Através de programas de prevenção da exposição, países desenvolvidos têm conseguido reduzir nos últimos anos o uso de chumbo, proporcionando uma diminuição drástica da concentração do metal no sangue da população. Enquanto isso nos países em desenvolvimento, o chumbo ainda é um importante problema de saúde pública. Na América Latina a população pobre está exposta à diferentes fontes, tais como fábricas de baterias, artesanato, mineração e fundições. A OMS (Organização Mundial de Saúde), CDC (*Center of Disease Control*) e ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) recomendam uma concentração de chumbo no sangue menor que $100\mu\text{g.L}^{-1}$ ^{96,97}.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de extrair/pré-concentrar diretamente traços e ultra-traços de Pb^{2+} em amostras de plasma e/ou soro humano, empregando RACNT em um sistema mecanizado de extração e análise por TS-FF-AAS.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Recobrir CNTs com BSA para a obtenção de RACNTs e avaliar sua capacidade de reter Pb^{2+} e excluir proteínas;
- b) Avaliar o desempenho dos RACNT para extração/pré-concentração “on-line” direta de Pb^{2+} em amostras de soro humano;
- c) Avaliar diferentes configurações para os sistemas em fluxo de extração/pré-concentração com sorvente sólido empacotado em colunas, visando elevar a velocidade analítica, minimizar consumo de reagentes e amostra e maximizar a resposta analítica;
- d) Avaliação das figuras de mérito (limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, faixa linear, entre outros pertinentes ao sistema de pré-concentração);
- e) Aplicar o método proposto na determinação de Pb^{2+} em fluidos proteicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão são apresentados os materiais, reagentes e procedimentos utilizados em todo o desenvolvimento do trabalho.

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste projeto foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada 18.2MWcm obtidas de um equipamento de purificação Milli-Q Direct Q3 da Millipore (Bedford, EUA).

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

Os padrões utilizados no trabalho foram preparados a partir da diluição de uma solução padrão estoque de Pb^{2+} (1,000 mg L^{-1}) (Sigma-Aldrich®). O ácido nítrico, o tampão acetato e fosfato (Sigma-Aldrich) foram utilizados no sistema FIA nas etapas de eluição e de limpeza.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS

Todas as medidas para determinação de Pb^{2+} foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica Shimadzu AA-6800 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma lâmpada de cátodo oco de chumbo e uma lâmpada de deutério para correção de fundo. Os resultados foram obtidos pelas medidas de absorbância (altura máxima do pico) a 283,3 nm, com corrente da lâmpada de cátodo oco fixada a 8 mA. O 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. Além disso, o sistema foi 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 (ID), contendo seis furos de 2,5 mm de diâmetro interno dirigidos ao queimador, permitindo a penetração da chama no interior do tubo. Um

capilar cerâmico não poroso de Al_2O_3 (Friatec, Mannheim, Alemanha) (comprimento de 10 cm, 0,5 mm ID) foi utilizado para conduzir a amostra em direção ao tubo de níquel. As morfologias dos adsorventes foram estudadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), EVO MA 15 (Zeiss, Jena, Alemanha), com uma tensão de aceleração de elétrons de 21,53 kV e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) (JEOL, JEM 2100, Peabody, USA), onde as amostras foram dispersas sobre uma grade de cobre que possuía uma película de carbono perfurada e analisadas usando a tensão de aceleração 200KV. Suas composições químicas foram analisadas por espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) X FLASH 6/10 (BRUKER, Venezia, Itália) (EDS).

Para o ensaio de exclusão de proteínas e avaliação do tempo total necessário para a limpeza da coluna, na etapa extração/pré-concentração, o canal do resíduo foi direcionado a uma cubeta de fluxo (de fabricação caseira contendo janelas de quartzo) e foram realizadas leituras a 240 nm em espectrofotômetro UV-VIS. O sistema FIA utilizado para extração/pré-concentração dos íons Pb^{2+} foi montado com uma bomba peristáltica (Ismatec IPC- 08, Glattzbrugg, Suíça), equipada com tubos de Tygon® para impulsionar todas as soluções de reagentes e amostras. Um injetor comutador de fabricação caseira (em acrílico) foi usado para comutar/selecionar as etapas de extração/pré-concentração, lavagem e eluição/amostragem.

4.3 PREPARO DOS RACNTs

Os CNTs foram oxidados da seguinte maneira: 500 mg de CNTs foram dispersos em 30 mL de ácido nítrico 65% (v/v). Essa dispersão foi aquecida a 120 °C por 60 min em um sistema de refluxo. Posteriormente, foram realizadas lavagens do material com água destilada para remoção do ácido e em seguida o material foi seco em estufa a 100 °C. Após estes procedimentos, o material foi modificado com albumina de soro bovino conforme descrito por Barbosa et al.⁶⁵.

No procedimento de recobrimento, os CNTs oxidados foram transferidos para um cartucho de SPE onde foi percolado 20 mL de albumina de soro bovino (BSA) 1% em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 7,0). Posteriormente, foi adicionado ao material 5 mL de solução de glutaraldeído 1%, seguido de repouso por 5 h. Após escoamento da solução residual o material foi transferido para um béquer de 100 mL onde recebeu 10 mL de solução de borohidreto de sódio 1%. O material revestido foi lavado e posteriormente acondicionado em água. Este

procedimento promoveu a formação de uma capa protéica que envolveu os nanotubos de carbono. Além de formar uma barreira física para macromoléculas, dependendo do pH da amostra (valor abaixo ou acima do ponto isoelétrico das proteínas da capa dos CNTs e da amostra), essas proteínas ficam ionizadas (+ ou -, respectivamente), causando repulsão eletrostática entre elas e evitando a interligação.

A minicoluna de RACNT foi construída com Nylon com dimensões de 2 mm d.i. x 3cm de comprimento. A coluna foi então preenchida com material adsorvente conforme descrito por Barbosa, A. F. e colaboradores⁵³.

4.4 CARACTERIZAÇÃO RACNTs

Os RACNTs foram caracterizados por SEM, TEM e EDS. No caso da caracterização por SEM as micrografias foram obtidas através da aplicação de materiais, que foram cobertos com uma fina camada de ouro e posteriormente as medidas foram realizadas com a aplicação de uma voltagem de 21,53 kV de aceleração de elétrons. Para realização de medidas de TEM as amostras foram dispersas sobre uma grade de cobre que possuía uma película de carbono perfurada e analisadas usando a tensão de aceleração 200kV. Para as medidas de EDS, os materiais foram dispersos sobre uma fita dupla face de carbono puro.

Os RACNTs foram avaliados quanto à sua capacidade para excluir proteínas. Inicialmente, 25 μL de solução padrão de BSA 44 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A área de sinal representa 100% de BSA; em outras palavras, toda a BSA chegou ao detector. Em outro experimento, a coluna que continha 30 mg do material de RACNTs foi acoplada ao sistema de HPLC, e a mesma solução de BSA foi injetada. As áreas dos picos obtidos dividida pela área de sinal de 100% de BSA representa a porcentagem de eluição de BSA .

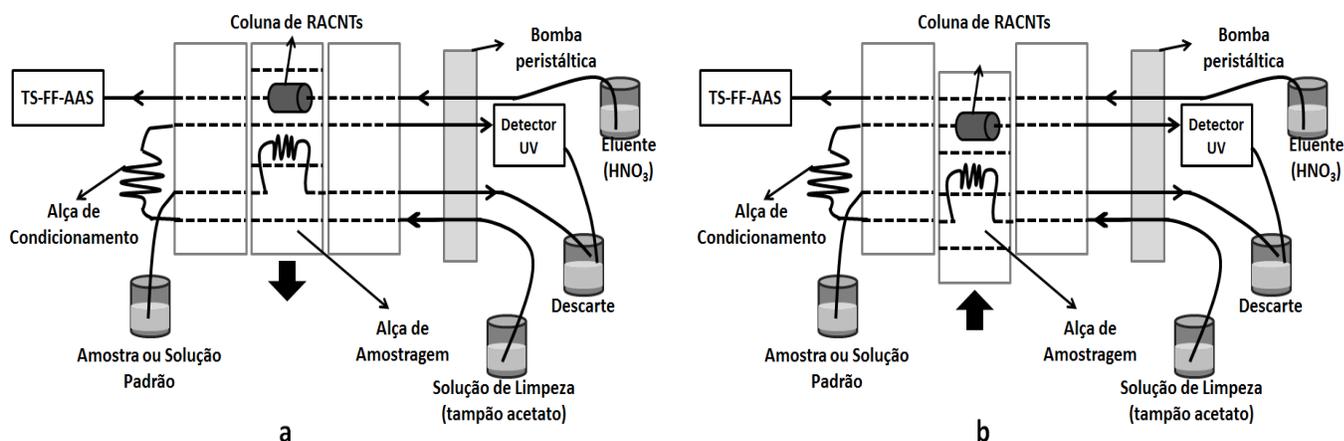
O estudo de cinética foi realizado pela adição de 10 mg dos RACNTs para cada um dos 18 tubos de polipropileno contendo 10 mL de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pb^{2+} (preparado por nitrato de chumbo em pH 5,7) a 25 ° C. Os tubos foram agitados durante 10, 25, 40, 55, 70 e 90 min (ensaio realizado em triplicata) a 252 g, e imediatamente centrifugados a 699 g durante 10 min. As concentrações de Pb^{2+} nos sobrenadantes foram analisadas por FAAS.

No estudo de isotermas, 10 mg de RACNTs foram adicionados em 18 tubos de ensaio contendo Pb^{2+} nas concentrações de 5, 30, 70, 120, 200, 350 $mg L^{-1}$. Os tubos foram agitados durante 10 min e imediatamente centrifugados durante 10 min a 252 g. As concentrações de Pb^{2+} no sobrenadante (C_e = concentração de equilíbrio) foram determinadas por FAAS. As capacidades de adsorção (Q_e), em $mg g^{-1}$, para cada concentração foram calculadas de acordo com a equação $Q_e = 0,01 \times (C_i - C_e)$, sendo C_i a concentração inicial de Pb^{2+} . As isotermas de adsorção foram representadas graficamente como uma função $Q_e = f(C_e)$. Os modelos matemáticos de isotermas de adsorção de Freundlich e Langmuir foram obtidos plotando as regressões lineares $\text{Log}(Q_e) = f(\text{log } C_e)$ e $C_e/Q_e = f(C_e)$, respectivamente, e o coeficiente de correlação linear maior foi usado para selecionar o melhor ajuste. Para o modelo de Langmuir, a capacidade máxima de adsorção (Q_m), e o fator de separação (K) foram calculados pelas equações $Q_m = CA^{-1}$ e $K = CL / ((CL + 1))$, respectivamente. CA e CL são os coeficientes angulares e lineares de regressão linear de Langmuir.

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

O Sistema FIA com detecção por TS-FF-AAS está apresentado na Figura 3. Na primeira etapa (Figura 3a), a alça de amostra é preenchida (volume total de 2 mL), e ao mesmo tempo a solução de HNO_3 0,1 $mol L^{-1}$ eluiu os analitos da coluna RACNT de uma etapa anterior de pré-concentração, conduzindo-os para detecção por TS-FF-AAS a uma vazão de 0,75 $mL min^{-1}$. Na etapa 2 (Figura 3b), o injetor é comutado, e a amostra é conduzida para a coluna contendo os RACNTs usando uma solução de tampão acetato (0,01 $mmol L^{-1}$, pH 5,7) a uma vazão de 0,75 $mL min^{-1}$ com um tempo total de 4,5 min. Os íons Pb^{2+} ficam retidos nos RACNTs, e as proteínas são totalmente excluídas. A solução tampão também tem a função de remover os resíduos da amostra da coluna. Por fim, o injetor é comutado para a posição inicial e os íons Pb^{2+} são eluidos e detectados por TS-FF-AAS. Uma alça de condicionamento foi necessária para a eliminação de resíduos de HNO_3 da coluna antes da nova etapa de extração/pré-concentração. A alça de condicionamento contém tampão acetato que carrega e neutraliza os resíduos de HNO_3 da coluna de sorção para que não haja contato direto entre as amostras e o ácido que provoca a precipitação de proteínas na coluna.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema de pré-concentração em fluxo com RACNT para determinação de Pb^{2+} .



Fonte: Do autor

Os fatores massa de adsorvente, volume, pH e vazão da amostra foram otimizados com objetivo de maximizar a resposta analítica / velocidade analítica.

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO SISTEMA

A influência dos fatores químicos e de fluxo envolvidos no sistema de pré-concentração em fluxo, incluindo: pH da amostra (pH_A), concentração do tampão (C_T), tipo de eluente (T_E), concentração do eluente (C_E), vazão de pré-concentração (V_P) e concentração do ligante (C_L), foi investigada por meio de um planejamento fatorial completo 2^4 , composto de 16 ensaios. Planejamentos desta natureza são indicados, pois podem reduzir consideravelmente o número de experimentos, comparado aos métodos univariados.

4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alfenas (processo CAAE: 19377213.3.0000.5142). Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 1000 g. As amostras de soro humano foram diluídas em tampão acetato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

e pH 5,7 a uma proporção de 1:1 v/v (soro:tampão). As amostras foram analisadas diretamente no sistema, sem qualquer tratamento prévio.

4.8 TRATAMENTO DOS DADOS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os padrões de Pb^{2+} foram preparados através de um “*pool*” de soro humano ($n = 25$) pela fortificação com Pb^{2+} de 7,0-260,0 $\mu g \cdot L^{-1}$. Os padrões foram diluídos com tampão acetato 0,01 mol L^{-1} e pH 5,7, a uma proporção de 1:1 - v/v (soro:tampão) antes das análises. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram definidos de acordo com a IUPAC⁹⁸, como $3\sigma/m$ e $10\sigma/m$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão de 10 leituras em branco e m é o coeficiente angular da curva analítica.

O fator de enriquecimento (FE), índice de consumo (IC), e os parâmetros de eficiência de concentração (EC) foram calculados para avaliar o desempenho do sistema de pré-concentração em linha. O fator de enriquecimento é definido com o aumento da sensibilidade TS-FF-AAS, inserindo o passo de pré-concentração e é calculado como a razão entre os coeficientes angulares das curvas obtidas por análise do método proposto e pelo sistema de TS-FF-AAS sem pré-concentração. O fator de enriquecimento operado a 1 min define a eficiência de concentração. O índice de consumo é o volume da amostra (mL) necessária para atingir uma unidade de fator de pré-concentração.

A precisão intra-dia foi avaliada como o desvio padrão relativo (RSD) de cinco ciclos independentes de pré-concentração usando um “*pool*” de branco de soro humano fortificado com Pb^{2+} nos níveis de 7,0; 100,0 e 260,0 $\mu g \cdot L^{-1}$. A precisão inter-dia foi avaliada repetindo os passos com os mesmos padrões de Pb^{2+} em três dias diferentes.

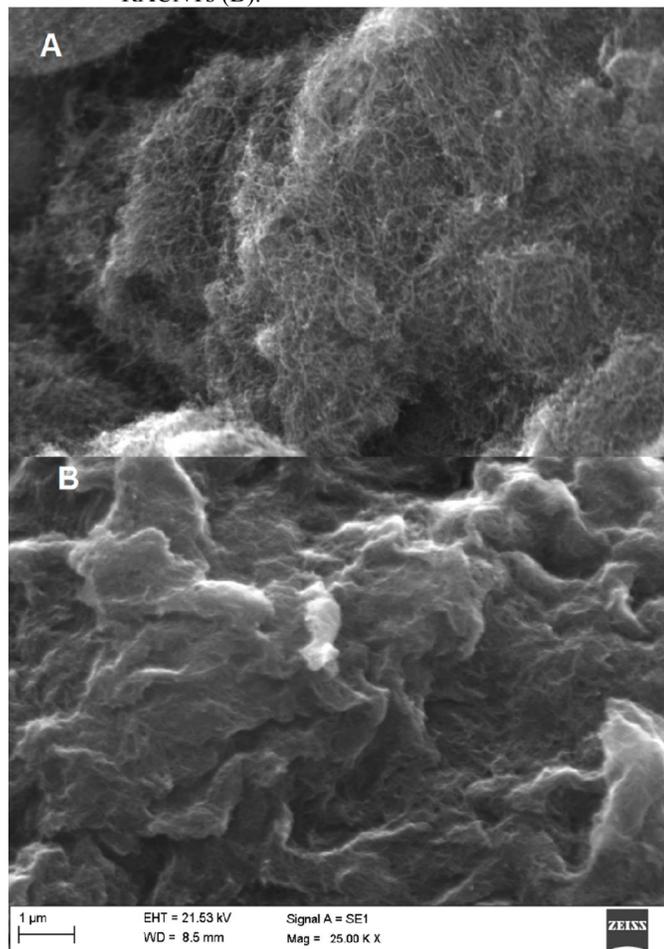
A exatidão do método proposto foi avaliada através de testes de recuperação fortificando seis amostras diferentes de soro humano, com níveis de Pb^{2+} de 5,0; 30,0; 50,0; 200,0 $\mu g \cdot L^{-1}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ADSORVENTE

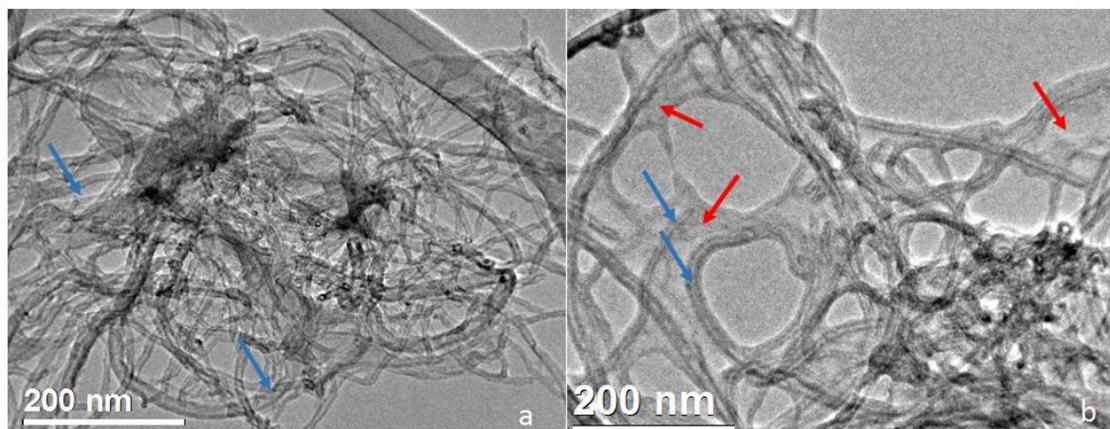
Na Figura 4 estão apresentadas a micrografias dos CNTs (A) e RACNTs (B). Nota-se que os filamentos de CNTs foram nitidamente observados, e que, o recobrimento com BSA (Figura 4 B) provocou a aglomeração dos CNTs e a superfície do material apresentou-se mais lisa^{99,100}, não permitindo a visualização nítida dos filamentos, como no material não recoberto. No processo de recobrimento, as moléculas de BSA reagem com glutaraldeído por reações de intercrossamento. No entanto, a reação ocorre com todas as moléculas de BSA do entorno fazendo com que haja a formação de aglomerados de CNTs recobertos com BSA. Com isso, uma película é formada sobre o material, impedindo a visualização nítida dos filamentos de CNTs. Embora a SEM seja uma técnica de grande importância para caracterização de materiais, ela não é capaz de fornecer informações estruturais de nanomateriais devido às limitações de resolução e ampliação dos materiais. Neste sentido, a técnica de TEM é mais indicada, uma vez que permite obter informações em escalas nanométricas com alta resolução e elevados fatores de ampliação. Na Figura 5 estão apresentadas as micrografias por TEM dos CNTs e RACNTs. Nota-se na Figura 5a, que os CNTs apresentam evidentes os nanotubos, com separação espacial e não apresentam nenhum material em sua superfície. Por outro lado, na Figura 5b, podemos observar que os nanotubos de carbono (indicados pela seta azul) estão cobertos (material indicado pela seta vermelha). O material de recobrimento é produto de intercrossamento de BSA por glutaraldeído. Observou-se que o material de recobrimento não se degradou com a focalização do feixe de elétrons na realização das medidas de TEM, o que não ocorre com a BSA. Tal fenômeno mostra a alta resistência obtida pelo material após a reação de intercrossamento.

Figura 4 - Micrografias eletrônicas de varredura dos CNTs (A) e RACNTs (B).



Fonte: Do autor

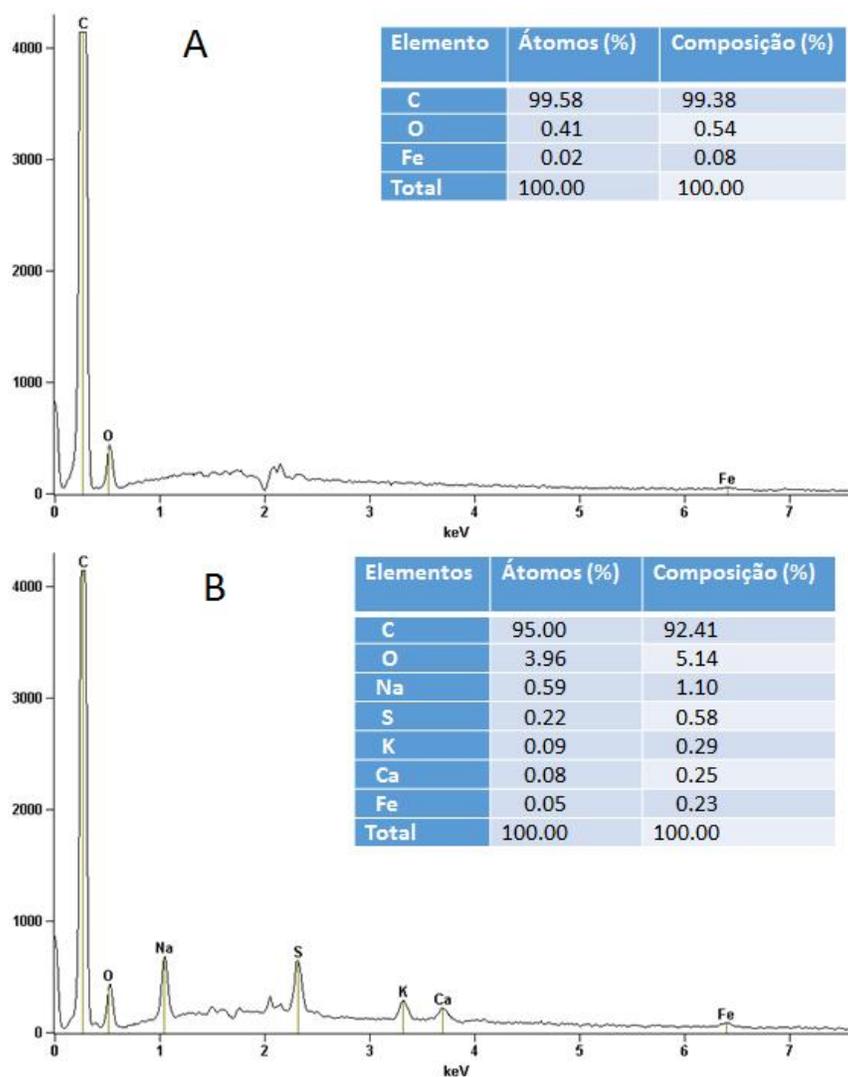
Figura 5 - Micrografias eletrônicas de transmissão dos CNTs (a) e RACNTs (b). Setas em azul indicam as estruturas dos CNTs e as setas em vermelho indicam a presença do recobrimento dos CNTs com BSA.



Fonte: Do autor

O recobrimento dos CNTs também foi caracterizado por EDS para uma avaliação qualitativa e semiquantitativa da composição. Nota-se na Figura 6A que os CNTs são formados por C, O e Fe. O oxigênio observado é proveniente da etapa de oxidação por HNO_3 e o Fe pode ser considerado como um resíduo de catalisador da etapa de síntese dos CNTs^{101, 102}. Na Figura 6B, observa-se a presença de outros elementos na composição do material como Na, S, K e Ca. Os elementos Na, K e Ca podem ser considerados como resíduos adsorvidos nos CNTs nas etapas de síntese devido ao uso de borohidreto de sódio (contendo resíduos de Ca e K). A presença de S e o aumento da porcentagem de O podem ser atribuídos ao recobrimento de proteínas (BSA) na superfície dos CNTs.

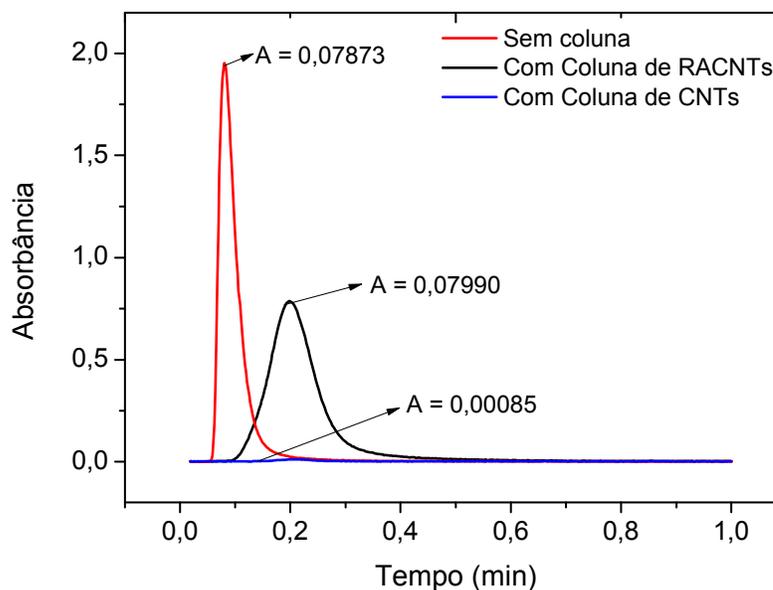
Figura 6 - Espectros de energia dispersiva para CNTs (A) e RACNTs (B), Live Time 100,0 s.



Fonte: Do autor

A Figura 7 representa os resultados do ensaio de exclusão de proteínas. Neste estudo, os valores de área são comparados com o padrão de 100% ($A=0,07873$), quando o sistema não possui nenhuma coluna. Nota-se nos resultados que, na presença da coluna empacotada com CNTs houve uma retenção de 98,92% de BSA. Quando a coluna foi empacotada com RACNTs, pode-se observar que a área ($A= 0,07990$) é numericamente igual ao padrão ($A=0,07873$), mostrando que aproximadamente 100% das proteínas foram excluídas. Nos ensaios realizados com a coluna empacotada com RACNTs, observa-se um alargamento do pico, comparado ao padrão, isso já era esperado, uma vez que a introdução de coluna no sistema de HPLC proporciona uma dispersão maior.

Figura 7 - Ensaio de exclusão de proteínas em colunas empacotadas com CNTs e RACNTs

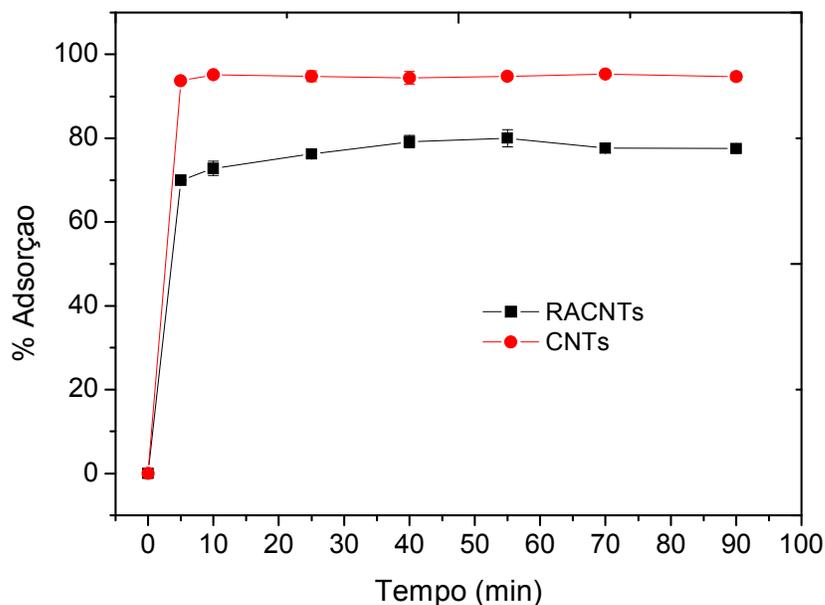


Fonte: Do autor

O efeito do tempo de agitação na adsorção do Pb^{2+} foi investigado. A Figura 8 mostra os resultados obtidos no ensaio de cinética de adsorção para CNTs e RACNTs. Para os dois materiais estudados a remoção de Pb^{2+} em solução aumentou com o tempo de contato até atingir um equilíbrio. O tempo de equilíbrio foi alcançado aos 10 min para os RACNTs e para os CNTs. O processo apresentou uma eficiência de remoção de $95,15 \pm 0,34\%$ e $79,16 \pm 1,45\%$ com CNTs e RACNTs, respectivamente. A sorção rápida de Pb^{2+} para os RACNTs com o alcance

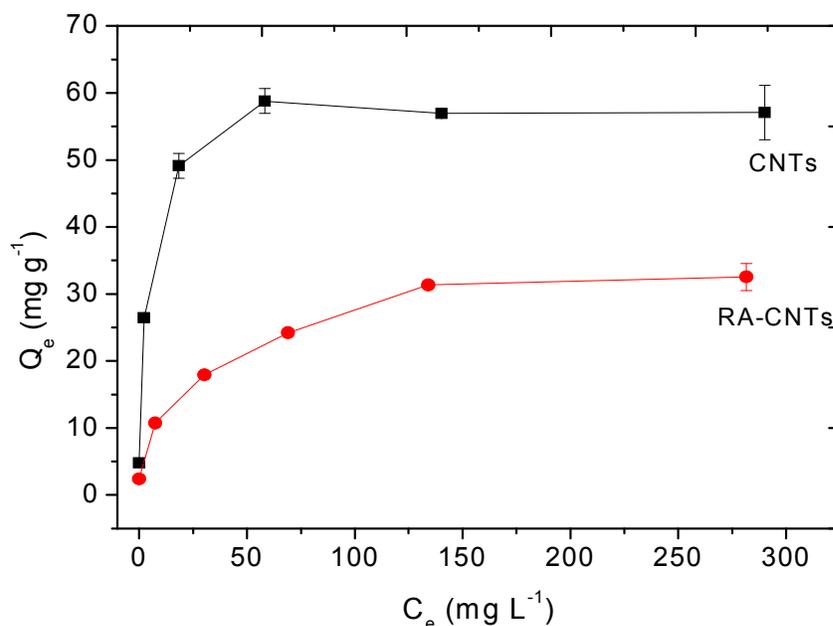
de equilíbrio em um período curto de tempo é uma indicação de que o adsorvente é eficiente e possibilita o desenvolvimento de um método “online” rápido de retenção de Pb^{2+} .

Figura 8 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de Pb^{2+} para CNTs e RACNTs.



Fonte: Do autor

Na figura 9 estão apresentados os resultados do estudo de isoterma. Como pode ser visto, os CNTs apresentaram uma capacidade de adsorção mais elevada em comparação com os RACNTs. Provavelmente, as moléculas de BSA do recobrimento dos RACNTs causam impedimento estérico em alguns sítios de adsorção dos CNTs, diminuindo a capacidade de adsorção. No entanto, a detectabilidade do método com RACNTs ainda foi adequada para a determinação de Pb^{2+} em soro humano¹⁰³. Os dados experimentais das isotermas para os CNTs e RACNTs foram avaliados de acordo com os modelos lineares de Langmuir e Freundlich. O melhor ajuste foi obtido para o modelo de Langmuir ($r > 0,99$, para os CNTs e RACNTs, ver Tabela 3). Estes resultados sugerem que o adsorvente contém sítios ativos distribuídos de forma homogênea e, que cada sítio de adsorção retém apenas um íon Pb^{2+} e que todos os sítios são energeticamente e espacialmente independentes da quantidade adsorvida ^{104, 105}.

Figura 9 - Estudo de adsorção de íons Pb^{2+} em CNTs e RACNTs.

Fonte: Do autor

Tabela 3 - Parâmetros do modelo de Langmuir e Freundlich obtidos para os CNTs e RACNTs

		CNT	RACNTs
Langmuir	K (L mg ⁻¹)	0.850	0.060
	Q_m (mg g ⁻¹)	58.82	34.48
	R^2	0.9997	0.9901
Freundlich	K_F	25.7	5.9
	1/n	0.169	0.323
	R^2	0.979	0.960

Nota: Equação do modelo de Langmuir: $Q_e = KQ_m C_e / (1 + KC_e)$; C_e = concentração de equilíbrio de Pb^{2+} ; Q_m = capacidade máxima de adsorção (mg g⁻¹); K = parâmetro relacionado com a afinidade de adsorbato e adsorvente. Equação do modelo de Freundlich: $\text{Log}(Q_e) = \text{Log}(K_F) + 1/n \text{Log}(C_e)$; K_F e n são constantes para adsorventes e adsorbato a uma dada temperatura.

Fonte: Do autor

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

Para otimização do sistema de extração/pré-concentração de Pb^{2+} foi empregado um planejamento fatorial 2^4 para estudo preliminar das variáveis intervenientes no sistema. No

experimento fatorial, realizado em duplicata e em ordem aleatória, 2 mL de soluções padrão ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas em solução tampão contendo 44 mg mL^{-1} de BSA foram percolados sobre 25 mg de RACNTs, com tempo total de extração/pré-concentração fixado em 5 min. As variáveis estudadas em seus níveis máximo e mínimo são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial completo 2^4 utilizado na otimização do sistema de extração / pré-concentração em fluxo de Pb^{2+} com detecção por TS-FF-AAS.

Variáveis	Níveis	
	Mínimo (-)	Máximo (+)
pH da amostra (pH_A)	4,7	7,0
Vazão de pré-concentração (V_P) (mL min^{-1})	0,76	0,90
Concentração do Tampão (C_T) (mol L^{-1})	0,002	0,01
pH de limpeza (pH_L)	4,7	7,0

Nota: *Tampão acetato para pH 4,7 e fosfato para pH 7,0.

Fonte: Do autor

O planejamento fatorial completo 2^4 empregado para avaliar os efeitos das variáveis em estudo e seus respectivos resultados encontra-se na Tabela 5. Foram dispostos 16 ensaios, realizados em duplicata contendo todas as combinações do planejamento fatorial 2^4 . No estudo de extração / pré-concentração de Pb^{2+} , adotou-se como resposta analítica a absorbância (altura de pico).

Tabela 5. Planejamento fatorial completo 2⁴ usado para avaliar o efeito das variáveis na extração/pré-concentração em fluxo de Pb²⁺ por RACNT.

Ensaio	pH _A	V _P	C _T	pH _L	Absorbância (altura de pico, n=2)	
1	-	-	-	-	0,086	0,083
2	+	-	-	-	0,060	0,052
3	-	+	-	-	0,106	0,081
4	+	+	-	-	0,071	0,073
5	-	-	+	-	0,124	0,134
6	+	-	+	-	0,034	0,029
7	-	+	+	-	0,122	0,126
8	+	+	+	-	0,04	0,05
9	-	-	-	+	0,098	0,106
10	+	-	-	+	0,052	0,05
11	-	+	-	+	0,102	0,104
12	+	+	-	+	0,059	0,049
13	-	-	+	+	0,120	0,131
14	+	-	+	+	0,043	0,036
15	-	+	+	+	0,072	0,071
16	+	+	+	+	0,032	0,032

pH_A= pH da amostra, V_P = vazão de pré-concentração; C_T = concentração do tampão; pH_L= pH da solução de limpeza da coluna.

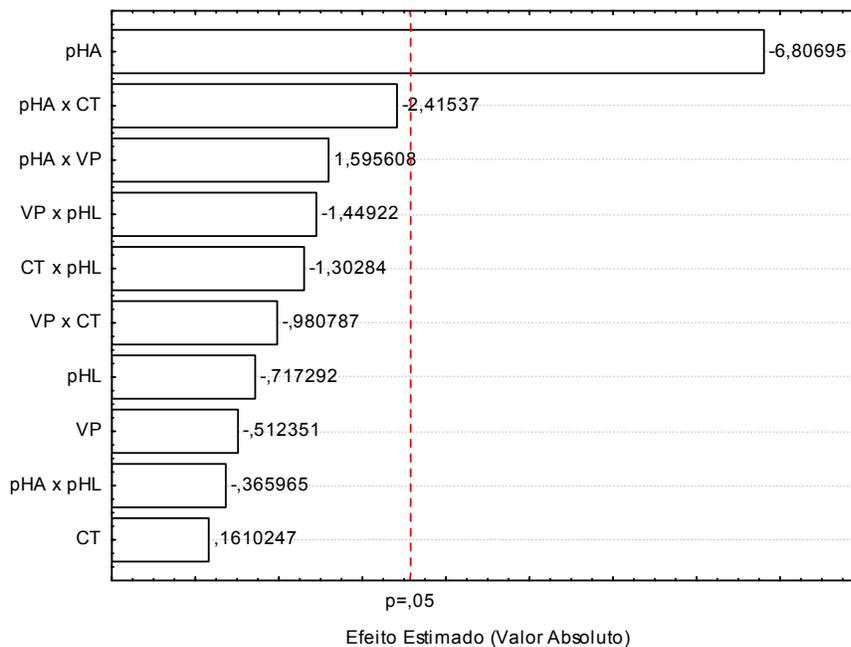
Fonte: Do autor

A significância das variáveis, além do efeito das interações, foi averiguada por meio da análise de variância (ANOVA) e representada pelo diagrama de Pareto (Figura 10), utilizando intervalo de confiança de 95%. A avaliação da significância das variáveis ocorre quando o comprimento das barras horizontais é superior à linha vertical em vermelho (nível de significância de 5%, p=0,05). Como pode ser observado, apenas o pH_A apresentou efeito significativo (-6,80695) indicando que o aumento no valor de pH resulta em decréscimo no sinal analítico. Tal comportamento mostra que a sorção de Pb²⁺ nos RACNTs ocorre em meio moderadamente ácido assim como para os CNTs⁵³. As demais variáveis, pH_L, C_T, V_P, e suas interações não apresentaram efeitos significativos nas faixas estudadas. Para a retenção de Pb²⁺ em RACNTs era esperado efeitos significativos como em CNT⁵³. No entanto, soluções de BSA assim como amostras de soro humano podem ser consideradas tampões naturais. Devido a viscosidade das amostras de soro humano ser mais elevada que a de soluções aquosas (gerando pressões elevadas), e devido ao reduzido volume de amostra, a faixa de estudo de V_P foi baixa. O aumento do pH_L, 4,7 a 7,0 não apresentou efeitos significativos. Com isso conclui-se que após a etapa de sorção (pH_A<7,0), soluções de limpeza com pH superior ao valor ótimo de sorção não compete com o Pb²⁺ pelos sítios ativos dos RACNTs. Com isso a V_P foi fixada em 0,76 mL min⁻¹ devido a maior estabilidade do sistema em fluxo, a concentração do tampão foi fixada em 0,002 mol L⁻¹. O pH_A foi estudado de forma univariada e os resultados obtidos estão

apresentados na Figura 11. Podemos observar que a condição ótima para sorção de Pb^{2+} é obtida em $pH = 4,7$. No entanto, este pH coincide com o ponto isoelétrico da BSA (cerca de $4,7^{106, 107}$) onde a carga elétrica total é nula. Neste pH pode haver retenção de proteínas e entupimento da coluna de extração/pré-concentração. Como a exclusão das proteínas ocorre quando o RACNT possui o recobrimento de albumina carregado negativamente ($pH > 5,6$), o $pH 5,7$ foi escolhido. O valor de pH_L foi fixado igual ao pH_A , garantindo que não haverá eluição dos analitos e proporcionando a remoção de resíduos da amostra na coluna.

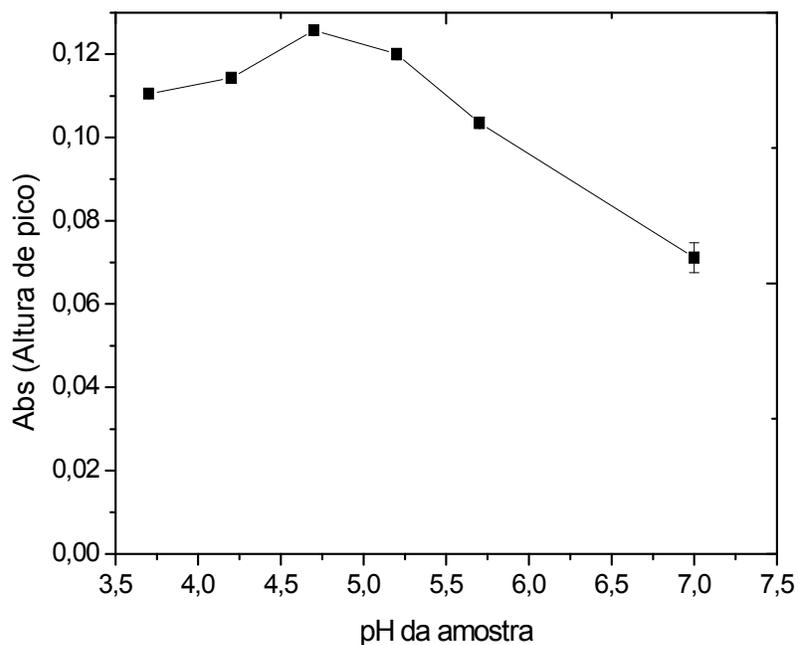
A massa de RACNTs foi avaliada com uso de 25 mg (usado na etapa de otimização das outras variáveis) e 35 mg. No entanto, com o aumento da massa de sorvente houve um aumento significativo na pressão do sistema causando vazamentos. Desta forma foi fixada a massa de 25 mg. O aumento do volume de amostras, superior a 2 mL causou aumento proporcional no sinal analítico. No entanto, houve também aumento do tempo de análise. Com isso optou-se pelo volume de amostra de 2 mL.

Figura 10 - Diagrama de Pareto obtido no estudo de otimização das variáveis e sua significância para adsorção de Pb^{2+} em RACNTs.



Fonte: Do autor

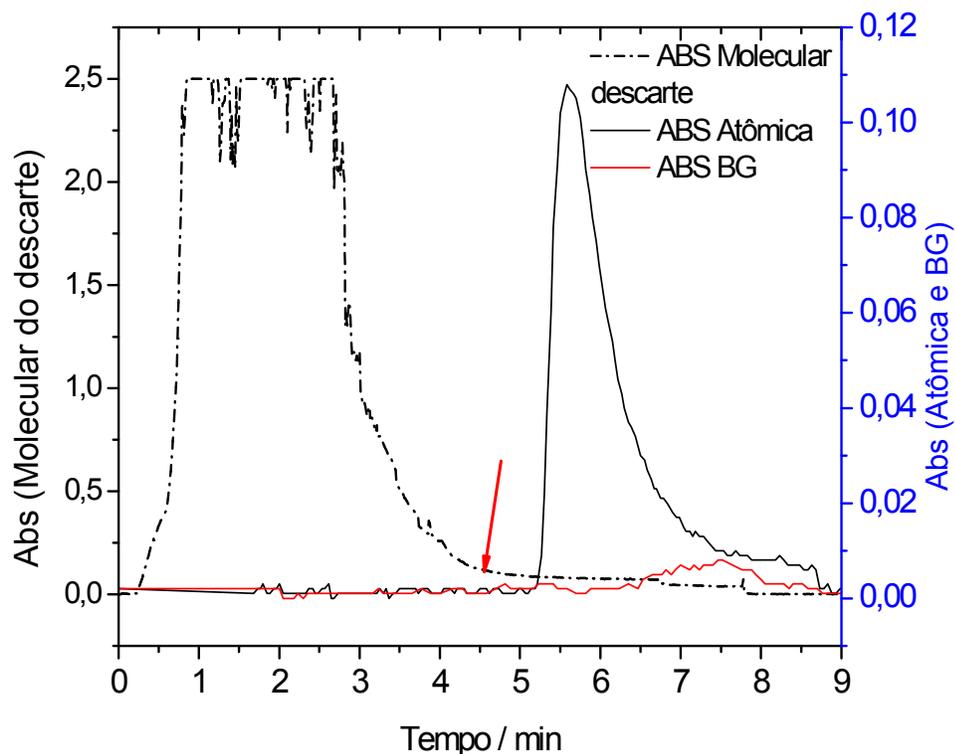
Figura 11 - Efeito do pH na extração/pré-concentração de Pb^{2+} em BSA 44 mg mL^{-1} .



Fonte: Do autor

Para avaliação do tempo total necessário para a etapa de limpeza de resíduos de amostras na coluna de RACNTs, foi realizado o estudo de exclusão, onde a saída dos resíduos do sistema FIA foi direcionado a uma cubeta de fluxo, com realização de leituras espectrométricas a 280 nm (Figura 12). Como mostrado na Figura 12, um tempo de extração/pré-concentração de 4,5 min é suficiente para eliminação total de proteínas da amostra na coluna de RACNTs. Após comutação (tempo indicado na Figura 12 como seta vermelha), podemos observar nas medidas realizadas por TS-FF-AAS que o sinal de background (BG) representa menos do que 1% do sinal analítico, mostrando que o tempo de 4,5 min é suficiente para limpeza da coluna. Do mais, não foram observados entupimentos da coluna de RACNTs e nem do capilar cerâmico do TS-FF-AAS, atestando a ausência de proteínas no sistema.

Figura 12 - Estudo de exclusão das proteínas com as respostas de absorção molecular da etapa de pré-concentração/limpeza da coluna e resposta de absorção atômica e correção de fundo para determinação de Pb^{2+} por TS-FF-AAS na etapa de eluição após otimização do sistema.



Fonte: Do autor

De acordo com a literatura,^{37-41,42,43,44-46, 47-50, 52,53,55,57} os efeitos de interferência de outros íons coexistentes com Pb^{2+} na adsorção em RACNTs não são observados para elevadas concentrações (valores de íons coexistentes que causam interferências não são encontrados em soro humano). Assim, o estudo não foi realizado neste trabalho, e, como pode ser observado nos ensaios de precisão e exatidão, não foram observadas interferências na extração/pré-concentração.

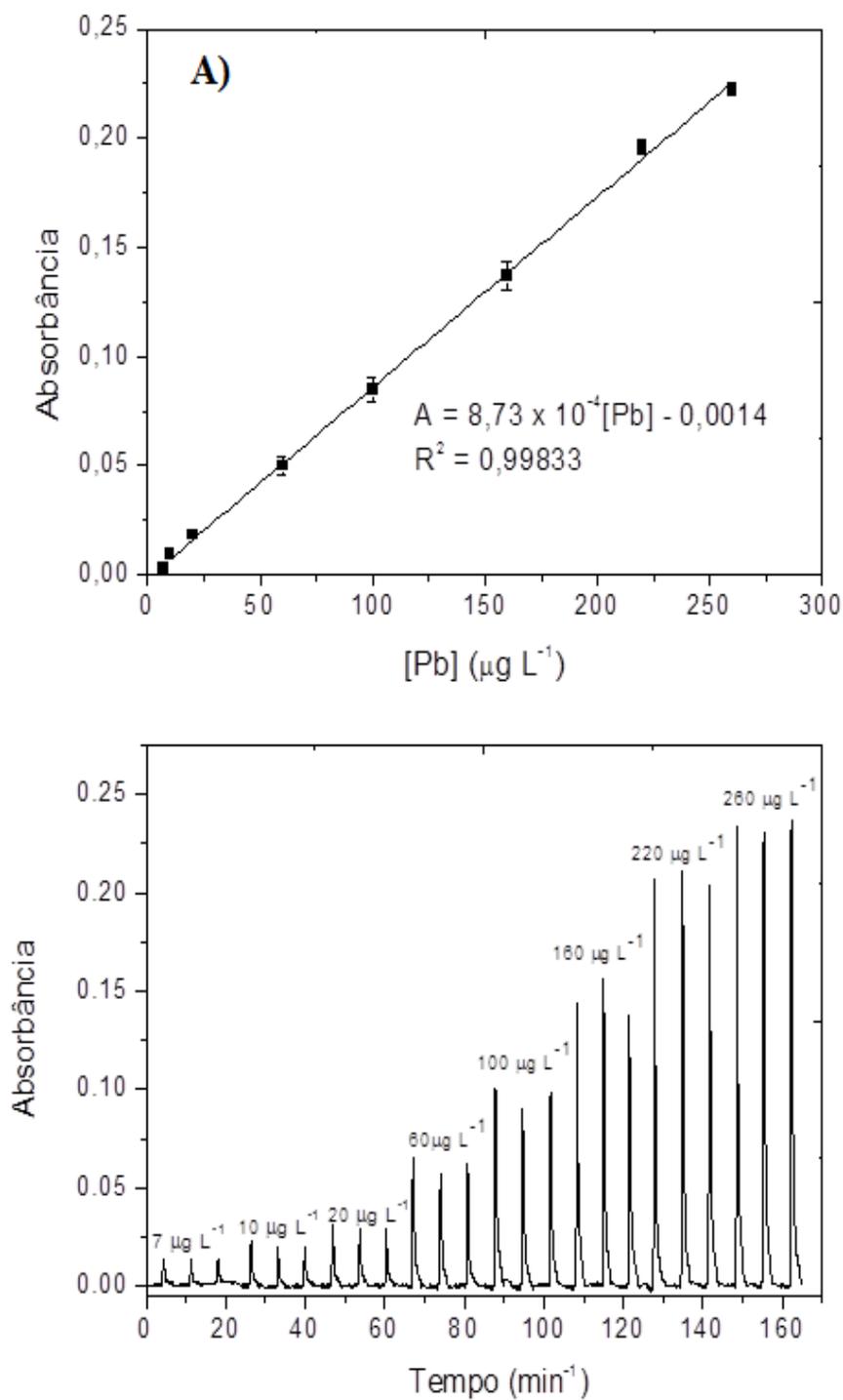
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO E APLICAÇÕES

O desempenho analítico da metodologia de extração/pré-concentração de Pb^{2+} foi avaliado sob as condições otimizadas. Foram avaliados os parâmetros de linearidade da curva de calibração, parâmetros de sistemas de análise por injeção em fluxo, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Os padrões de calibração analítica foram preparados pela fortificação de um “pool” de 20 amostras de soro humano (na proporção de 50% em tampão acetato pH 5,7). Esta estratégia é conhecida como calibração com matriz correspondente e é necessária, uma vez que a extração direta não é uma extração exaustiva, não havendo a remoção quantitativa do Pb^{2+} da amostra. Ademais, esta é uma estratégia amplamente aplicada para extração direta de compostos orgânicos em matrizes complexas em metodologias analíticas que não permitem a extração total do analito da amostra^{108, 78, 64, 109}.

A Figura 13 mostra a curva analítica e o respectivo registro de sinais da análise de “pool” de soro sanguíneo fortificado com Pb^{2+} em concentrações de 7,00 a 260,0 $\mu g L^{-1}$, com satisfatório coeficiente de correlação linear ($r = 0,9983$).

Os parâmetros de validação do método proposto, incluindo parâmetros de sistema em fluxo, estão apresentados na Tabela 6. O valor de referência de Pb^{2+} em soro humano é 32,5 $\mu g L^{-1}$ ¹¹⁰. Com isso, podemos observar que o método proposto apresenta limite de quantificação inferior ao valor de referência, possibilitando a aplicação da metodologia para quantificação de Pb^{2+} até mesmo em indivíduos não expostos. Os estudos de precisão intra-dias e inter-dias apresentaram RSD máximo de 8,1% que são adequados para as análises realizadas. A exatidão do método foi estudada pelo método de adição e recuperação onde amostras de soro humano foram analisadas antes e após a fortificação com diferentes níveis de concentração de Pb^{2+} . Os resultados do estudo de exatidão estão apresentados na Tabela 7. As recuperações de Pb^{2+} nas amostras variaram de 89,4-107,3%, comprovando a eficácia do método nas determinações e a ausência de efeitos de interferentes para as amostras estudadas. A concentração de Pb^{2+} nas amostras de soro humano estudadas variaram de 14,97 a 77,97 $\mu g.L^{-1}$.

Figura 13 - Curva analítica (A) e respectivos registros de sinal (B) para extração/pré-concentração de Pb^{2+} em RACNTs para padrões preparados em “pool” de soro humano 50% (v/v) em tampão acetato pH 5,7). 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 6 - Parâmetros analíticos para extração e determinação direta de Pb^{2+} em soro humano por TS-FF-AAS.

Faixa Analítica / $\mu g L^{-1}$	7,0 – 260,0	
Equação para o método desenvolvido para pré-concentração de Pb^{2+} com RACNTs e determinação por TS-FF-AAS (n = 3)	$A = 8,73 \times 10^{-4} C - 0,0014$	
Coefficiente de Correlação	0,9983	
Limite de Detecção / $\mu g L^{-1}$	2,1	
Limite de Quantificação / $\mu g L^{-1}$	7,0	
Fator de Enriquecimento**	5,5	
Frequência de Amostragem / h^{-1}	7,5	
Índice de Consumo / mL **	0,37	
Eficiência de Concentração / min^{-1} *	2,04	
	Concentração ($\mu g L^{-1}$)	RSD (%)
Precisão Intra-dia (n = 5)	7	2,3
	100	6,8
	260	2,7
Precisão Inter-dia (n = 3; 5)	7	5,1
	100	8,1
	260	4,2

Notas: * Considerando 2,27 e 2,23 min como tempos de pré-concentração e limpeza respectivamente.

** Para o cálculo dos fatores de fluxo, FE, IC e EC foi considerado a concentração analítica de Pb^{2+} nos padrões, uma vez que os valores apresentados na curva analítica correspondem aos valores de concentração no soro humano que sofreu diluição de 50% em solução tampão. Assim, a concentração analítica dos padrões (valor absoluto) é 50% menor.

Fonte: Do autor

Tabela 7 - Resultados dos testes de exatidão para determinação de Pb²⁺ em amostras de soro humano.

Amostra	Concentração de chumbo adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração de chumbo encontrado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	0	$16,5 \pm 1,1$	105,0
	50,0	$69,8 \pm 6,0$	
2	0	$15,0 \pm 1,7$	107,3
	200,0	$231,0 \pm 12,1$	
3	0	$44,7 \pm 2,4$	102,5
	200,0	$250,9 \pm 2,9$	
4	0	$78,0 \pm 6,9$	101,2
	30,0	$109,3 \pm 6,1$	
5	0	$28,3 \pm 2,9$	104,9
	30,0	$61,2 \pm 4,0$	
6	0	$28,7 \pm 1,8$	89,4
	50,0	$70,3 \pm 3,4$	

Fonte: Do autor

Notas: Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. (n=3)

Como pode ser observado na Tabela 8, apresentamos uma breve comparação entre o método proposto com outros já relatados na literatura. Nota-se que a maioria das metodologias necessitam de etapas prévias de mineralização e/ou precipitação de proteínas antes da determinação por ETAAS. Além disso, em alguns casos foi necessário o uso da técnica de adição de padrões para evitar a interferência devido a efeitos de matriz. O destaque da nossa metodologia está relacionado com a sua simplicidade, não exigindo etapas prévias de digestão das amostras e uso de sistema FIA, que possibilita a limpeza em linha dos fluidos de proteínas.

Tabela 8 - Comparação de diferentes métodos de espectrometria de absorção atômica utilizados para determinação de Pb^{2+} em fluidos biológicos.

Técnica	Amostra	Etapa Prévia de Preparo de Amostra	Limite de Detecção ($\mu g.L^{-1}$)	Ref.
ETAAS	Sangue	Digestão em Forno de Micro-ondas	0,83	111
ETAAS	Sangue	Digestão em Forno de Micro-ondas	6,0	112
ETAAS	Sangue e soro	Precipitação de Proteínas por ácido nítrico/Técnica de adição de padrões.	30,0	113
ETAAS	Sangue e Soro	Mineralização em forno de micro-ondas	12,00	114
ETAAS	Sangue	Precipitação de Proteínas	0,65	115
TS-FF-AAS	Soro humano	Diluição	2,1	Este trabalho

Fonte: Do autor

Os RACNTs apresentaram uma elevada vida útil, considerando as caracterizações realizadas para o material e os resultados para exclusão de proteínas e retenção de Pb^{2+} , a coluna de RACNTs apresentou o mesmo desempenho durante, pelo menos, 200 extrações sequências de Pb^{2+} em amostras de soro humano, sem qualquer procedimento de preparação de amostra.

6 CONCLUSÃO

Os RACNTs descritos no trabalho apresentaram elevada habilidade de extrair íons Pb^{2+} diretamente de soro humano utilizando apenas diluição. Nota-se que foi possível realizar a exclusão de proteínas em um sistema em fluxo de forma rápida e completa. O material disposto na coluna pode ser usado por mais de 200 extrações sequenciais em amostras de soro humano sem perda de sua capacidade de exclusão e extração de Pb^{2+} .

No método de pré-concentração de Pb^{2+} usando sistemas em fluxo acoplado a TS-FF-AAS, os RACNTs, se mostraram promissores como extratores sólidos para íons metálicos e exibiram além da capacidade extratora, capacidade de pré-concentração dos íons Pb^{2+} (fator de enriquecimento = 5,46) permitindo a quantificação de Pb^{2+} em níveis de $\mu g.L^{-1}$.

O método proposto foi validado adequadamente para determinação de íons Pb^{2+} nas amostras de soro humano, apresentando boas figuras de mérito, como baixo limite de quantificação, boa precisão (inter-dias e intra-dias), baixo consumo de amostras (necessário para amostras biológicas). Do ponto de vista da frequência analítica, apresentou elevada frequência analítica considerando todas as etapas da análise onde não há a necessidade de preparo prévio das amostras.

Por fim, consideramos que os RACNTs podem ser facilmente empregados para extração direta de outros analitos orgânicos e inorgânicos em diferentes amostras com complexidade similar ao soro humano, minimizando o tempo de análise total por não necessitar de etapas prévias de preparo de amostra. Considerando o emprego de sistemas FIA e automação em geral, é possível que o tempo de análise seja ainda minimizado com emprego de sistemas de extração de múltiplas colunas de RACNTs.

REFERÊNCIAS

- ¹ SHIZHONG, C. et al. The use of carbon nanofibers microcolumn preconcentration for inductively coupled plasma mass spectrometry determination of Mn, Co and Ni. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 11, p. 1216-1221, 2007.
- ² 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.
- ³ BHUSHAN, R.; KUMAR, R. Comparative application of microwave, ultrasonication, ultracentrifugation and conventional heating for preparation of sample as dinitrophenyl derivative for direct enantioseparation of certain amino alcohols and 1-amino-2-propanol from vitamin B12 hydrolysate on α 1-acid glycoprotein and β -cyclodextrin columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7941-7945, 2009.
- ⁴ HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.
- ⁵ SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, n. 8, p. 1207-1268, 1996.
- ⁶ BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1-3, p. 63-80, 1998.
- ⁷ HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis – facts and traps. **Talanta**, v. 54, n. 6, p. 1021-1038, 2001.
- ⁸ NOBREGA, J. A. et al. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n.12, p. 1855-1876, 2002.
- ⁹ BOCK, R. A. Handbook of Decomposition Methods in Analytical Chemistry, London: **International Textbook Company**, 1979.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2618-2641, 2010.
- ¹² STOEPLER, M. **Sampling and Sample Preparation. Practical Guide for Analytical Chemists**, Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- ¹³ KUBRAKOVA, I. Microwave-assisted sample preparation and preconcentration for ETAAS. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 9-10, p. 1469-1481, 1997.
- ¹⁴ MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**, New Jersey, 2004.

-
- ¹⁵ ARRUDA, M. A. Z.; Santelli, R. E. Mecanização do preparo de amostras por microondas: O estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.
- ¹⁶ POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.
- ¹⁷ CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 7, p. 1177-1233, 2003.
- ¹⁸ 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.
- ¹⁹ NAMIÉŠNIK, J. Trends in environmental analytics and monitoring. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2-3, p. 221-269, 2000.
- ²⁰ 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.
- ²¹ 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.
- ²² 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.
- ²³ 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.
- ²⁴ THURMAN, E.M.; MILLS, M.S. Solid Phase Extraction: Principles and Practice. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 14, p. 988, 1998.
- ²⁵ 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.
- ²⁶ 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.
- ²⁷ 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.
- ²⁸ 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.

-
- ²⁹ RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2618-2641, 2010.
- ³⁰ HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Carbon nanotubes applications in separation science: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 1-30, 2012.
- ³¹ LATORRE, C. H. et al. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 749, n. 24, p. 16-35, 2012.
- ³² IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- ³³ 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.
- ³⁴ 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.
- ³⁵ ZHAO, X. et al. Preparation of high-grade carbon nanotubes by hydrogen arc discharge. **Carbon**, v. 35, n. 6, p. 775-781, 1997.
- ³⁶ LI, Y. H. et al. Lead adsorption on carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 357, n. 3-4, p. 263-266, 2002.
- ³⁷ 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.
- ³⁸ 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.
- ³⁹ 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.
- ⁴⁰ 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.
- ⁴¹ 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.
- ⁴² 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.

-
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ 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.
- ⁴⁶ 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.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ 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.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ 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.
- ⁵¹ MUNOZ, 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.
- ⁵² 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.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ 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.
- ⁵⁵ 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.

-
- ⁵⁶ EL-SHEIKH, A. H. 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.
- ⁵⁷ 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.
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ 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.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ 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.
- ⁶² 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.
- ⁶³ 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.
- ⁶⁴ 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.
- ⁶⁵ BARBOSA, A. F. et al. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 213-220, 2015.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ 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.

-
- ⁶⁸ 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.
- ⁶⁹ 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.
- ⁷⁰ 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.
- ⁷¹ 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.
- ⁷² 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.
- ⁷³ 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.
- ⁷⁴ EGGLE, 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.
- ⁷⁵ 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.
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ 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.
- ⁷⁸ 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.
- ⁷⁹ MUSTEATA, F. M.; WALLIS, 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.

-
- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ 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.
- ⁸² 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.
- ⁸³ 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.
- ⁸⁴ 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.
- ⁸⁵ 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.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ 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.
- ⁸⁸ HOGENDOORN, E.; ZOONEN, 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.
- ⁸⁹ 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.
- ⁹⁰ 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.

-
- ⁹¹ 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.
- ⁹² HERBER, R. F. M.; STOEPLER, M. **Biological Specimens**, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- ⁹³ 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.
- ⁹⁴ FABRINO, H. J. F. **Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Metais de Interesse em Soro e Sangue Humanos por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- ⁹⁵ TIMBRELL, J. A. **Introduction to toxicology**. 2. ed. London: Taylor & Francis, p. 76-77, 111-114, 1995.
- ⁹⁶ MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 251-260, 2004.
- ⁹⁷ FAO/OMS. Documento de Trabajo sobre El Pombo, 26ª Reunion Del Comite Del Codex sobre Aditivos Contaminantes de los Alimentos. São Paulo, 1994.
- ⁹⁸ CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, 127-134, 1999.
- ⁹⁹ XU, W. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198-7207, 2010.
- ¹⁰⁰ DU, B. et al. A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. **Talanta**, v. 129, n. 1, p. 465-472, 2014.
- ¹⁰¹ Ivanov, V. et al. The study of carbon nanotubes produced by catalytic method. **Chemical Physics Letters**, v. 223, n. 4, p. 329-335, 1994.
- ¹⁰² Piedigrosso, P. et al. Production of differently shaped multi-wall carbon nanotubes using various cobalt supported catalysts. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, n. 1, p. 163-170, 2000.
- ¹⁰³ 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.

-
- ¹⁰⁴ 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.
- ¹⁰⁵ LIMOUSIN, G. et al. Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement, **Applied Geochemistry**, v. 22, n. 1, p. 249-275, 2007.
- ¹⁰⁶ EMERSON, T. E. Unique features of albumin: A brief review. **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 7, p. 690-694, 1989.
- ¹⁰⁷ 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.
- ¹⁰⁸ 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.
- ¹⁰⁹ 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.
- ¹¹⁰ 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.
- ¹¹¹ OLMEDO, P. et al. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, n. 1, p. 60-67, 2010.
- ¹¹² DAFTSIS, E. J.; ZACHARIADIS, G. A. Analytical performance of ETAAS method for Cd, Co, Cr and Pb determination in blood fractions samples. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 722-730, 2007.
- ¹¹³ 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.
- ¹¹⁴ VIITAK, A.; VOLYNSKY, A. B. Simple procedure for the determination of Cd, Pb, As and Se in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using colloidal Pd modifier. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 890-895, 2006.
- ¹¹⁵ 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, n. 1, p. 246-252, 2008.