CARLOS ALFREDO SUÁREZ

Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda G. Giné Rosias

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Suárez, Carlos Alfredo
Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos / Carlos Alfredo Suárez; orientadora Maria Fernanda G. G. Rosias. - - Piracicaba, 2010.
147p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Compostos organometálicos 2. Cromatografia líquida de alta eficiência 3. Cromatografia por troca iônica 4. Eletroforese capilar de zona 5. Espectrometria de massas I. Título

CDU 564.19:543.05

A minha filha, Ana, fonte de toda inspiração e alegria,
porque já não consigo imaginar a vida sem você.....

A minha esposa, Lorena, amiga e companheira,
por estar ao meu lado, e não desistir de mim.....

Aos meus pais Alfredo e Margarita e meus irmãos Marcelo,
Gustavo e Celeste,
Pela educação, carinho e amizade, por estarem sempre apesar das distâncias.....

DEDICO.

A minha esposa Lorena e minha filha Ana pela paciência,

À professora Maria Fernanda, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e amizade,

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realizar meu doutorado,

Ao CNPq pela bolsa e pelo apoio financeiro,

Aos meus sogros Nidia e Guile, por considerarme realmente parte de sua família,

A minha cunhada Guadalupe, pela amizade e alegria de viver contagiante,

À Fátima e Sheila pela inestimável ajuda e disponibilidade durante estes longos anos de pesquisa,

Ao professor Boaventura pelos ensinamentos em eletrônica e pelo espaço em sua oficina,

À Mário e Marcelo pela amizade, paciência e disposição para a montagem dos diversos circuitos eletrônicos utilizados durante esta pesquisa,

Ao Professor José Ferreira, pela sessão do espaço para trabalhar com seus equipamentos,

A Gabriel e Zé Paulo pela ajuda com as análises no final deste doutorado,

Aos professores Chico e Zagatto, e aos técnicos Tatinha e Valdemir pelo convívio armonioso,

Ao professores Jorge Sarkis e Marco Aurélio Arruda pelo espaço gentilmente cedido em seus laboratórios, a Mauricio e Marcelo pela ajuda e assessoramentos dentro dos mesmos,

A todos os colegas e amigos da sessão de Química Analítica, pelos bons momentos de descontração e diversão.

Aos funcionários da Pós-Graduação e da Biblioteca do CENA-USP, pelo suporte técnico oferecido sempre com boa disposição e amabilidade,

Agradeço

RESUMO

SUÁREZ, C. A. **Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos**. 2010. 147 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Neste projeto foram abordados procedimentos analíticos para extração, separação e identificação de espécies de arsênio encontradas normalmente em quantidades de traços e ultra-traços em amostras biológicas e ambientais. Entre as amostras alvo deste estudo, teve-se alimentos de origem marinha como por exemplo camarão. Foi avaliada a estabilidade das espécies de arsênio nas soluções geradas pelos processos de extração. Para separação das espécies inorgânicas (arsenito e arsenato), metiladas (ácidos mono e dimetil arsênio) e orgânicas (arsenobetaina) empregaram-se as técnicas eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida (LC). Os sistemas de separação para a determinação das espécies de arsênio foram acoplados com os espectrômetros massas (ICP-MS), e de fluorescência atômica (AFS). Os sistemas acoplados apresentaram resolução e sensibilidade na determinação das espécies de arsênio nas amostras estudadas neste trabalho. A extração com água de espécies de As utilizando-se banho de ultra-som apresentou eficiência acima de 78%. A estabilidade das espécies nas soluções padrão e nos extratos das amostras foi mantida por um período de até uma semana quando armazenadas em geladeira (+4°C). Visando uma política de química limpa, foi desenvolvida uma metodologia para evitar desperdiço preparando micro-volumes de amostras e soluções padrão, para especiação de arsênio por eletroforese capilar. Para tal se empregou um injetor seqüencial, também foi desenvolvido um dispositivo de injeção hidrodinâmica para eletroforese capilar. Além disto, as soluções residuais geradas durante a pesquisa analítica foram tratadas para a recuperação de arsênio e boro. A extração no ponto nuvem foi empregada para recuperar As entanto que a precipitação por mineralização hidrotérmica foi aplicada para a recuperação de B . A aplicação deste procedimento resultou na extração de 80% de arsênio e 75% de boro. Isto, permitiu converter grandes volumes de resíduos líquidos perigosos em um pequeno volume de resíduos sólidos.

Palavras-chave: Especiação de arsênio. Extração por ultra-som. Eletroforese capilar. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas com fonte de plasma. Espectrometria de fluorescência atômica.

ABSTRACT

SUÁREZ, C. A. **Stability of arsenic species in biological samples by coupling liquid chromatography or capillary electrophoresis with atomic detectors**. 2010. 147 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Analytical procedures for extraction, separation and identification of arsenic species at ultra-trace levels in biological and environmental samples were investigated. Stability studies of arsenic species in sample extracts and standard solutions were carried out. Separation of arsenite, arsenate, monomethylarsonic and dimethylarsinic acids and also arsenobetaine were carried out by capillary electrophoresis or liquid chromatography. Determination of the separated arsenic species was accomplished by coupling the separation techniques to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) or atomic fluorescence spectrometry (AFS). Satisfactory resolution and sensibility were achieved by the coupled systems described. Extraction efficiency better than78% were achieved with water in an ultrasonic bath at the laboratory temperature (23-27°C). Whereas, stability of species in solutions stored in refrigerator at +4°C was efficient for aperiod up to one week. Micro-volumes of standards and sample solutions mixed in a sequential injector were prepared for arsenic speciation by capillary electrophoresis, aiming green chemistry. A time controlled micro-volume injector device for hydrodinamic injections was also developed. Finally, waste solutions from arsenic speciation analysis in a system with hydride generation were treated for arsenic and boron removal. Cloud point extraction for recovery of arsenic and hydrothermal mineralization of boron by calcium hydroxide were employed. Satisfactory removal of 80% of arsenic and 75% of boron from waste solution was achieved. These procedures allowed to reduce volumes of hazardous waste solutions.

Keywords: Arsenic speciation. Ultra sound extraction. Capillary electrophoresis. Liquid chromatography. Inductively coupled plasma mass spectrometry. Atomic fluorescence spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Eficiência do método de extração por ultra-som empregando somente água como solvente, por comparação do teor total de arsênio nas soluções dos extratos e do material digerido. Validação do método utilizando Material Certificado de Referência Dorm-2. 37
Figura 2.2 – Estabilidade das espécies de arsênio durante o procedimento de extração em banho de ultra-som a intervalos de 15, 30 e 60 minutos. Os desvios para arsenito, arsenato, monometilarsênio e dimetilarsênio foram de 0,96; 0,99; 1,17 e 0,59 respectivamente. 38
Figura 2.3 – Cromatograma do extrato de uma amostra de camarão adicionada com arsenito, arsenato, monometilarsênio e dimetilarsênio, extraídos em banho de ultra-som durante uma hora com a mistura 20:80 metanol-água. 39
Figura 2.4 – Estabilidade das espécies em solução. Degradação das espécies em soluções padrão armazenadas ema geladeira. Línea pontilhada = solução preparada no dia. Linea sólida = cromatograma após 3 semanas. 41
Figura 3.1 - Sistema de eletroforese capilar. Foto do sistema de eletroforese capilar projetado no Laboratório de Química Analitica do CENA. 1. Base, 2. Hastes, 3. Vareta, 4. Injetor, 5. Unidade controladora de gás, 6. Válvulas solenóide, 7. Circuito eletrônico, 8. Detector UV/Visível, 9. Recipiente coletor, 10. Fonte de alta voltagem. 57
Figura 3.2 - Circuito eletrônico temporizador. Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para controle automático do tempo de injeção de amostras no injetor hidrodinâmico. V1 e V2 = válvulas solenóides de três vias; PBS = botão de pulso (trigger); Tr = transistor BC547; D1, D2 e D3 = diodos 1N4007; S = Botao de liga e desliga. O circuito eletrônico contendo um circuito integrado temporizador, 555 IC, atua como controlador dos tempos de acionamento de V1 e V2. (Desenvolvido por Sivanildo S. Borges (PQ). 58
Figura 3.3 – Influência do pH e da ddp aplicada. Variação da corrente elétrica observada com relação aos diferentes pH da solução eletrolítica e à voltagem aplicada 60
Figura 3.4 – Interface CE-ICP. Interface para o acoplamento da eletroforese capilar com espectrômetros de massas o de emissão ótica com fonte de plasma (CE-ICP). a y b mostram duas posições distintas do extremo do capilar no interior do canal de amostragem do nebulizador. 64
Figura 3.5 – Câmara de separação de fases. Interface para o acoplamento de sistemas de eletroforese capilar ou cromatografia líquida projetado e confeccionado no laboratório de Química Analítica do CENA/USP 69
Figura 3.6 – Eletroferograma de um extrato de camarão seco, extraído em banho de ultra-som empregando-se água como solvente. Se observa o pico correspondente à arsenobetaina além de outros três picos não identificados (?)....71
Figura 3.7 - Separação de espécies de arsênio em amostra de camarão extraída por ultra-som com água como solvente. Adição de As^{5+}, MMA, DMA e As^{3+}, em concentração 100 μg/L cada expressados como molécula. (As^{5+}: 52,6 %As; MMA: 53,5% As; DMA: 54,3% As; As^{3+}: 59,5% As). 72
Figura 3.8 – Eletroferograma de quatro espécies de arsênio separadas por eletroforese capilar com geração de hidretos na interface e detecção por espectrometria de massas com fonte de plasma. CE-HG-ICP-MS. 73
Figura 3.9 – Eletroferograma de espécies de arsênio em uma amostra de urina contaminada, empregando eletroforese capilar com geração de hidretos na interface com detecção por ICP-SFMS. 74
Figura 4.1 – Esquema do sistema LC-HG-AFS montado no laboratório, A e B são os tampões empregados; V= válvula solenóide, BP= bomba Peristáltica, GL= Câmara de separação gás/Líquido e AFS o detector de fluorescência atômica. 83

Figura 4.2 – Cromatograma de quatro espécies de arsênio, em diferentes concentrações, quando empregada uma vazão da bomba cromatográfica igual a 1,5 mL/min. 93
Figura 4.3 – Sensibilidade do detector de fluorescência atômica. Cromatograma de uma solução padrão de As^{3+} em concentração 10 μg/L indicando a variação na relação sinal ruído com as diferentes combinações de sensibilidade do detector empregadas, utilizando alça de amostragem de 100 μL. 94
Figura 4.4 - Triplicata da separação de quatro espécies de arsênio, As^{3+}, DMA, MMA e As^{5+} pelo sistema acoplado LC-HG-AFS, empregando as condições de trabalho apresentadas na Tabela 4.1. 95
Figura 5.1 - Peça em formato T para o acoplamento CE-ICP-MS. Observa-se nesta figura a passagem do capilar através dela, além da inserção perpendicular ao capilar para a platina e o tubo para bombeamento da solução auxiliar 107
Figura 5.2 - Representação esquemática do sistema SIA, com uma bomba de seringa de 500 µL e uma bobina para mistura das soluções também de 500 µL e o recipiente para a posterior injeção hidrodinâmica de 200 µL. 108
Figura 5.3 - Esquema do injetor hidrodinâmico construído em acrílico, onde CE é o capilar eletroforético, S um septo que permite fixar o capilar impedindo vazamentos no sistema, SV é o recipiente de 200 mL e Pt o eletrodo de platina. À esquerda da figura se apresenta o sistema controlado eletronicamente para a injeção temporizada onde V1 e V2 são as válvulas solenóide conectadas em linha, EI o circuito eletrônico, GU o controlador de pressão do gás e Ar o cilindro de argônio. 110
FIGURA 5.4 - Eletroferograma de uma amostra de urina liofilizada contendo arsenito (As^{3+}), arsenato (As^{5+}), ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). 200 µg/L de As^{5+} e DMA foram adicionados à amostra. 117
Figura 5.5 - Eletroferograma de um extrato de camarão pelo sistema CE-ICP-MS detectado na razão m/z= 75. De esquerda para a direita os picos correspondem à arsenobetaina e ao arsenato (As^{5+}) adicionado respectivamente. 118
Figura 6.1 - Percentagens de arsênio extraído das soluções laboratoriais de descarte mediante extração no ponto nuvem empregando diferentes concentrações do complexante utilizado. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Espécies de arsênio encontradas no meio ambiente (Gong, Lu *et al.*, 2002).....22
Tabela 3.1 – Pka's de espécies de arsênio. Apresentam-se os pka's conhecidos das espécies de arsênio em sistemas biológicos e ambientais Adaptado de (Larsen, 1998; Le, Lu *et al.*, 2004; Sun, Macka *et al.*, 2004; Wu e Ho, 2004; Kitagawa, Shiomi *et al.*, 2006; Jaafar, Irwan *et al.*, 2007). *R corresponde às diferentes estruturas de açúcares ligados ao arsênio. 52
Tabela 3.2 – Recopilação de trabalhos que empregaram eletroforese capilar para a separação de espécies de arsênio, se indica nesta tabela o tipo e pH do tampão empregado, modificador de fluxo, caso utilizado, voltagem aplicada, tempo de análise e espécies separadas(*) indicando a ordem de aparecimento das espécies nos respectivos eletroferogramas.....54
Tabela 3.3 – Condições operacionais do acoplamento CE-ICP-MS para a obtenção dos eletroferogramas apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7 respectivamente.....65
Tabela 3.4 – Parâmetros empregados para o acoplamento CE-HG-ICP-SFMS para separação das espécies de arsênio em amostras de urina e camarão.....70
Tabela 4.1 – Parâmetros de operação do sistema acoplado LC-HG-AFS. 96
Tabela 4.2 – Tempos de retenção de cada espécie de arsênio estudada quando empregada uma vazão constante de 1 mL/min.....97
Tabela 5.1 - Parâmetros operacionais para as condições de trabalho empregando o acoplamento CE-ICP-MS. 112
Tabela 5.2 - Volumes em nL injetados no capilar empregando as diversas combinações de pressão aplicada e tempo de injeção. (n=3).....114
Tabela 5.3 - Tempos de migração e áreas dos picos calculados após 5 injecoes, detectadas a 185 nm 115
Tabela 6.1 - Resultados da % extraída do arsênio presente nas soluções de descarte originais e nos precipitados obtidos após o tratamento pelo método de extração no ponto nuvem. (n=3).....131

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 Preparação de Amostras para Análise de Espécies 17
Resumo 18
Abstract 19
2.1 Introdução 20
2.2 Métodos de extração 23
2.2.1 Extração enzimática 25
2.2.2 Extração por microondas 27
2.2.3 Extração por ultra-som 28
2.3 Procedimentos de preservação das espécies de As em solução 30
2.4 Material e Métodos 32
2.4.1 Reagentes, soluções e equipamentos. 32
2.4.2 Procedimentos de extração 33
2.4.3 Conservação das amostras e dos extratos 35
2.5 Resultados e Discussão 36
2.5.1 Eficiência do método de extração 36
2.5.2 Interconversão de espécies 37
2.5.3 Interferências nas análises dos extratos 38
2.5.4 Estabilidade das espécies em solução e dos extratos 40
2.5.5 Espécies tóxicas na decomposição natural da amostra de camarão 42
2.6 Conclusões 42
3 Especiação de As por Eletroforese Capilar Acoplada a Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma 44
Resumo 45
Abstract 46
3.1 Introdução 47
3.2 Material e Métodos 49
3.2.1 Reagentes, soluções e equipamentos 49
3.3 Desenvolvimento Experimental 51
3.3.1 Sistema de eletroforese capilar 56
3.3.2 Efeito da variação do pH e da ddp aplicada em eletroforese capilar 59
3.3.4 Acoplamento do sistema de eletroforese capilar com ICP-MS 61
3.3.5 Acoplamento da eletroforese capilar com o ICP-MS e geração de hidretos na interface 66
3.4 Resultados e Discussão 70
3.4.1 Determinação de espécies de arsênio pelo sistema acoplado CE-ICP-MS 70
3.4.2 Determinação de espécies de arsênio pelo sistema acoplado CE-HG-ICP-MS 73
3.5 Conclusões 75
4 Especiação de As por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Fluorescência Atômica 76
Resumo 77
Abstract 78
4.1 Introdução 79
4.2 Material e Métodos 81
4.2.1 Reagentes, soluções e equipamentos 81

4.2.2 Sistema LC-HG-AFS 82
4.2.3 Volatilização das espécies de arsênio 83
4.2.4 Espectrometria de Fluorescência Atômica 86
4.2.5 Acoplamento da coluna de cromatografia líquida com o Espectrômetro de Fluorescência Atômica 88
4.3 Resultados e Discussão 90
4.3.1 Efeito das vazões de hidrogênio e argônio 90
4.3.2 Efeito da vazão dos reagentes inseridos pós-coluna 91
4.3.3 Efeito das combinações de ajuste da sensibilidade do detector 93
4.4 Conclusões 97
5 Minimização dos Resíduos Gerados Durante a Pesquisa 99
Resumo 100
Abstract 101
5.1 Introdução 102
5.2 Material e Métodos 105
5.2.1 Sistema de Injeção Seqüencial 105
5.2.2 Injeção Hidrodinâmica 105
5.2.3 Interface CE-ICP-MS 106
5.3 Procedimento Experimental 107
5.3.1 Injeção Seqüencial para preparo das soluções padrão 108
5.3.2 Introdução de amostras no CE 109
5.3.3 Separação das espécies e recondicionamento do capilar 111
5.3.4 Otimização dos parâmetros na interface CE-ICP-MS 112
5.4 Resultados e Discussão 113
5.5 Conclusões 118
6 Recuperação dos Resíduos Gerados Durante a Pesquisa 120
Resumo 121
Abstract 122
6.1 Introdução 123
6.2 Material e Métodos 125
6.2.1 Reagentes e soluções 125
6.2.2 Equipamentos 126
6.2.3 Recuperação de arsênio 126
6.2.4 Recuperação de boro 128
6.3 Resultados e Discussão 130
6.3.1 Extração de arsênio 130
6.3.2 Extração de boro 131
6.4 Conclusões 132
REFERÊNCIAS 134

1 INTRODUÇÃO

No meio ambiente, os elementos traço apresentam normalmente comportamentos diferentes aos esperados em função das propriedades químicas do elemento em questão. A obtenção de informações sobre a espécie encontrada em determinadas condições se torna um pré-requisito fundamental para uma melhor compreensão de sua distribuição, atividade biológica, e das interações com o meio ambiente.

O arsênio apresenta uma biogeoquímica oceânica complexa, cujo estudo e compreensão são importantes uma vez que se refletem na toxicidade de organismos marinhos. A concentração de arsênio em águas oceânicas é aproximadamente de 1,7 μg/L, sendo o arsenato (As^{5+}) a forma predominante. O arsenito (As^{3+}), a forma mais tóxica e potencialmente carcinogênica, raramente se apresenta em concentrações maiores do que o 20% do arsênio total (NEFF, 1997). A toxicidade do arsênio depende de sua forma química e de seu estado de oxidação, os quais apresentam diversos efeitos biológicos e toxicológicos nos seres vivos. Além das formas inorgânicas como arsenito e arsenato, encontram-se nos organismos vivos, compostos organometálicos como ácido monometil e dimetil arsênio (MMAA e DMAA), óxido de trimetilarsina (TMAO), arsenobetaina (AsB), íon tetrametilarsênio (TMA^{+} ou TETRA), arsenoaçúcares e arsenolipídeos (PHILLIPS, 1990).

Alimentos de origem marinha, tais como algas, mexilhões, ostras e moluscos possuem principalmente arsenobetaina, arsenocolina (AsC) e arsenoaçúcares. Considerando que a maior parte do As ingerido pelo homem provêm de alimentos de origem marinha diversos estudos tem sido feitos sobre a degradação das formas orgânicas de As. Entretanto, tem sido verificadoa que a arsenobetaina se elimina

rapidamente na urina sem aparentes modificações metabólicas. Portanto, existe a percepção de que todas as espécies organoarseniacais de alimentos de origem marinho sejam excretados sem alterações, sem provocar efeitos indesejáveis à saúde humana (LE et al., 2004). Por conseguinte, arsenobetaina parece não ser acumulada nem mesmo metabolizada no organismo de seres humanos. Entretanto, uma publicação muito recente, (NEWCOMBE et al., 2010), a partir de resultados da análise de urina de cinco voluntários submetidos a uma dieta de arroz e suco de soja, sem teor de arsenobetaina, discutem a possibilidade de que a mesma seja metabolizada no organismo, uma vez que foi detectada arsenobetaina na urina de três dos cinco voluntários utilizados na pesquisa.

A decomposição de animais marinhos contendo arsenobetaína sugere a biodegradação para as formas mais tóxicas de arsênio (metiladas) pelos microorganismos existentes na flora dos mesmos (KAISE et al., 1998; JENKINS et al., 2003). Da mesma forma, a decomposição das algas marinhas nos solos em regiões da Escócia e Inglaterra, revelou a formação de espécies inorgânicas, arsenito e arsenato e as formas metiladas MMA e DMA, mais tóxicas (PENGPRECHA et al., 2005). Assim, a conservação dos produtos marinhos, usados como alimentos ou remédios, deve evitar a degradação das espécies As-orgânicas, o que disponibiliza as espécies tóxicas de arsênio. Deste modo, estudos de preservação destas espécies durante o preparo e conservação das amostras tornam-se importantes.

Os métodos para determinação de espécies de arsênio em tecidos biológicos são precedidos normalmente por processos de extração, com misturas de etanol ou metanol/água, em alguns casos realiza-se uma segunda extração para remover lipídeos (SZPUNAR, 2000). O emprego da extração enzimática e também da

extração assistida por microondas foi descrita (LAMBLE e HILL, 1996; PARDO-MARTINEZ et al., 2001; RATTANACHONGKIAT et al., 2004; ACKERMAN et al., 2005; SANZ et al., 2005). Cabe salientar a importância dos processos de cocção dos alimentos, não só visando a extração das espécies de interesse, como assim também o estudo das interconversões e, a possível biodisponibilização de espécies tóxicas.

Os alimentos são considerados a maior fonte de arsênio ingerido por populações de áreas que não apresentam problemas de contaminação natural ou antropogênica Estudos referentes à alimentação humana, realizados em vários paises, revelaram uma grande variabilidade na ingestão diária total de arsênio, com valores que oscilaram entre 10 μg/dia para os moradores de Mumbai na India (TRIPATHI *et al.*, 1997) e 345 μg/dia para a população do Japão (HERCE-PAGLIAI et al., 1999). Os alimentos do mar são os contribuintes principais na ingestão total de arsênio, por tanto, torna-se importante um estudo das variacões no conteúdo total de arsênio e das espécies encontradas nestes alimentos (DEVESA et al., 2008).

A separação das espécies de arsênio tem sido realizada principalmente por métodos cromatográficos, tais como, cromatografia gasosa GC (do inglês Gás Chromatography), cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (do inglês High Performance Liquid Chromatography) e cromatografia iônica IC (do inglês Ion Chromatography), ou por eletroforese capilar CE (do inglês Capillary Electrophoresis). Uma variedade de detectores atômicos tem sido acoplada ao HPLC, incluindo absorção atômica com chama FAAS (HANSEN *et al.*, 1992) (do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry), fluorescencia atômica AFS (do ingles Atomic Fluorescence Spectrometry) (MESTER; FODOR, 1997) , emissão ótica com plasma acoplado indutivamente ICP OES (do inglês Inductively Coupled Plasma

Optical Emission Spectrometry) e espectrometria de massas com fonte de plasma ICP-MS (do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), (ZHANG et al., 1996). Na maioria dos casos a derivatização para formação de hidretos, visando incrementar a sensibilidade dos sistemas, torna-se necessária. Nestes casos, há necessidade da redução, em linha, das espécies orgânicas, para facilitar a reação de geração dos hidretos. Entre as técnicas utilizadas para conseguir esta decomposição em linha têm-se a fotoredução com luz ultravioleta (SLEJKOVEC et al., 2001), decomposição por microondas (BURGUERA; BURGUERA, 1997), ou térmica (LOPEZ et al., 1993). Zhang e colaboradores descreveram a fotooxidação em linha com fonte ultravioleta (UV) após a separação por cromatografia de troca iônica (ZHANG et al., 1996). Estes autores relataram a determinação de As(III), As(V) MMA e DMA por HG-AAS em amostras de soro de pacientes com arseno-uremia.

Gómez-Ariza e colaboradores (GOMEZ-ARIZA et al., 2001) pesquisaram procedimentos de extração, concentração e derivatização, prévio à separação cromatográfica, para determinação de espécies de As em amostras ambientais. A acidificação é comum em amostras de água e outros líquidos para deter ou minimizar atividades biológicas. Entretanto, este procedimento não é recomendado quando as amostras contêm espécies organo-metálicas, uma vez que estas são degradadas em condições ácidas. Nestes casos, são comumente utilizados solventes tais como, tolueno e metanol (ALI; JAIN, 2004). Feldman e colaboradores pesquisaram o efeito do ácido clorídrico (HCl) e alguns aditivos como nitreto sódico (NaN_3), cloreto de trimetil benzil amônia, ácido benzóico, cloreto de cetilpiridinio e metanol sobre amostras de urina, relatando a degradação dos compostos

organoarseniacais em amostras acidificadas na presença de alguns destes aditivos (FELDMANN et al., 1999).

Em estudos de especiação o preparo de amostras torna-se essencial, uma vez que, amostras com elevado conteúdo de sais causam problemas na separação por eletroforese capilar, resultando em picos alargados, devido à alteração do fluxo eletroosmótico (ALI; JAIN, 2004). Por outra parte, na separação por cromatografia líquida deve ser considerada a compatibilidade entre a matriz das amostras e a fase móvel (FALLON et al., 1987).

2 Preparação de Amostras para Análise de Espécies

Resumo

Neste capítulo descrevem-se os fundamentos para a extração das espécies de arsênio em amostras biológicas, apresenta-se uma pequena mais detalhada revisão sobre estado da arte em técnicas de extração enzimática, extração assistida por microondas e extração por ultra-som para análise de especiação, empregando diferentes solventes como meio extrator. Entretanto, nesta pesquisa foi avaliada a eficiência da extração assistida por ultra-som em amostras de tubarão e camarão. Foi conseguida uma eficiência de extração maior que 78% do arsênio total no material de referência certificado DORM-2. A interconversão das espécies durante o procedimento de extração foi avaliada submetendo uma solução padrão contendo as espécies ao mesmo procedimento de extração aplicado às amostras. Foi avaliada a preservação das espécies nos extratos e nas soluções padrão. Estes extratos foram posteriormente analisados pelo sistema acoplado LC-HG-AFS.

Abstract

The main considerations for arsenic species extraction from biological samples are presented in this chapter. A little review about enzymatic, microwave and ultrasonic assisted extraction on arsenic speciation from biological samples, by employing different solvent is also offered. Furthermore the efficiency of ultra-sound extraction was evaluated in shark and shrimp samples. An efficiency better than 78% was achieved from DORM-2 certified reference material. Ultra-sound extraction was also applied to a multi-species standard solution for stability studies of species during extraction procedure. Extracts and solutions in this work were further analyzed by LC-HG-AFS

2.1 Introdução

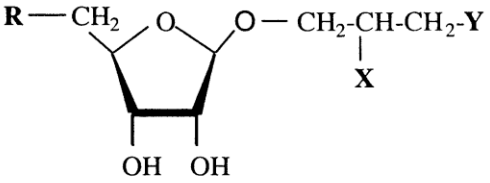
Quando a meados do século passado começa a vigorar a idéia de especiação associando-a com efeitos tóxicos e, se começa a perceber a importância da determinação da espécie química na qual o elemento em questão se encontra, ao invés da determinação da determinação de teores totais, surge a necessidade de desenvolver metodologias confiáveis e robustas que permitam a determinação das espécies presentes nas diversas matrizes abordadas, sem incorrer em erros devido a possíveis interconversões ou degradação das espécies.

Historicamente em química analítica instrumental os esforços foram focados na redução de limites de detecção e na ampliação da faixa linear das curvas analíticas. Embora os detectores mais robustos provejam atualmente limites de quantificação da ordem de partes por trilhão, tanta sensibilidade freqüentemente se torna desnecessária uma vez que o erro absoluto introduzido nas diferentes etapas do processo analítico pode ser de uma ordem de magnitude maior. O erro introduzido durante o preparo de amostras pode atingir 50% do erro total, entretanto este erro pode ser ainda maior se considerarmos o preparo de amostras para análise de especiação onde, matrizes complexas, baixas concentrações das espécies envolvidas e distribuição heterogênea das mesmas implicam geralmente na necessidade de implementar procedimentos adicionais como purificação e/ou pré-concentração. Portanto a otimização de processos de amostragem, preservação das espécies e melhorias na eficiência de recuperação das espécies durante o preparo de amostras se tornam de vital importância, constituindo-se estes parâmetros no principal objetivo em desenvolvimento de metodologias para análise de especiação (MORIN et al., 1992; CAMARA, 2005).

Além da água potável, os seres humanos estão expostos ao arsênio através dos alimentos de origem marinha, os quais contêm as maiores concentrações de arsênio. Mais de duas dúzias de espécies de arsênio têm sido detectadas (Tabela 2.1), embora existe apreensão acêrca da eficiência dos métodos de extração os quais podem destruir as espécies originais. A excreção urinaria representa a exposição recente ao arsênio devido à curta vida media das espécies e por tanto, a especiação de arsênio em urina se considera como biomarcador de exposição (GONG et al., 2002).

Tabela 2.1 – Espécies de arsênio encontradas no meio ambiente (Gong, Lu *et al.*, 2002).

Nome	Abreviatura	Fórmula química
Arsenito (ácido arsinoso)	As^{III}	$As(OH)_3$
Arsenato (ácido arsínico)	As^{V}	$AsO(OH)_3$
Ácido monometilarsônico	MMA^{V}	$CH_3As(OH)_2$
Ácido monometilarsinoso	MMA^{III}	$CH_3As(OH)_2$
Ácido dimetilarsínico	DMA^{V}	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Ácido dimetilarsinoso	DMA^{III}	$(CH_3)_2As(OH)$
Óxido de trimetilarsina	TMAO	$(CH_3)_3AsO$
Trimetilarsina	TMA^{III}	$(CH_3)_3As$
Íon tetrametilarsônio	Me_4As^+, TMA^+	$(CH_3)_4As^+$
Dimetilarsinoil etanol	DMAE	$(CH_3)_2AsO(CH_2)_2OH$
Arsenobetaina	AsB	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
Arsenobetaina 2	AsB-2	$(CH_3)_3As^+(CH_2)_2COO^-$
Arsenocolina	AsC	$(CH_3)_3As^+(CH_2)_2OH$
Arsinas	AsH_3, $MeAsH_2$, Me_2AsH	$(CH3)_xAsH_{(3-x)}$; (x=0-3)
Etilmetilarsina	$Et_xAsMe_{(3-x)}$	$(CH_3CH_2)_xAsMe_{(3-x)}$; (x=0-3)
Roxarsone	Roxarsone	$(OH)NO_2PhAs(OH)_2O$
Ácido fenilarsônico	PAA	$PhAsO(OH)_2$
Ácido hidroxifenilarsônico	4-HPAA	$(OH)PhAs(OH)_2O$
p-aminobenzenoarsonato	PABA	$NH_2PhAsO(OH)_2$
Ácido Aminohidroxifenilarsônico	3-AHPAA	$NH_2(OH)PhAsO(OH)_2$
Ácido nitrofenilarsônico	4-NPAA	$NO_2PhAsO(OH)_2$
Ácido hidroxinitrofenilarsenico	3-NHPAA	$NO_2(OH)PhAsO(OH)_2$
Ácido ureidofenilarsônico	p-UPAA	$NH_2CONHPhAsO(OH)_2$
Arsênio com grupos ribosidios	Arsenoaçúcares	



	R	X	Y
X	$(CH_3)_2As(O)$-	-OH	-OH
XI	$(CH_3)_2As(O)$-	-OH	$-OPO_3HCH_2CH(OH)CH_2OH$
XII	$(CH_3)_2As(O)$-	-OH	$-SO_3H$
XIII	$(CH_3)_2As(O)$-	-OH	$-OSO_3H$
XIV	$(CH_3)_2As(O)$-	$-NH_2$	$-SO_3H$
XV	$(CH_3)_3As^+$-	-OH	$-OSO_3H$

A temperatura e a forma de cocção dos alimentos também podem modificar as espécies e concentrações de arsênio, neste sentido, Devesa e colaboradores

apresentaram recentemente uma completa revisão sobre os efeitos da temperatura durante a cocção de alimentos ricos em teor de arsênio (DEVESA et al., 2008).

Devido à ampla abrangência da palavra especiação e, às inúmeras abordagens sobre este tema encontrados na literatura, neste capítulo se considera prioritariamente a especiação química de compostos de arsênio. Apresenta-se uma detalhada revisão do estado da arte em preparo de amostras para análise de especiação, empregando extração enzimática, assistida por microondas e por ultra-som.

Nesta pesquisa se avaliou a eficiência do procedimento de extração por ultra-som, assim como também a ocorrência de possíveis interconversões das espécies nos procedimentos de extração. Estudou-se também a estabilidade dos extratos conservados em geladeira a 4°C e, ao abrigo da luz.

2.2 Métodos de extração

As metodologias mais usadas para extração de espécies de arsênio são extração Soxhlet, sonicação, extração assistida por microondas, extração acelerada por solvente e extração por fluido supercrítico. A sonicação favorece a homogeneização de amostras sólidas. A extração assistida por microondas envolve aquecimento das amostras com solvente ou combinação destes, gerando a partição das espécies entre as fases. Os solventes mais comumente utilizados são: água, diferentes proporções de metanol/água e metanol/água/clorofórmio (ALI; JAIN, 2004).

A extração de espécies organoarseniacais assistida por microondas utilizando metanol e mistura de metanol-água tem sido relatada (DAGNAC et al., 1998;

GOMEZ-ARIZA et al., 2000b). Na extração em banho de ultra-som de espécies de arsênio em ostras, não foram evidenciadas diferenças significativas na eficiência de extração quando empregados os solventes, água, metanol e metanol-água (1:1). (MCSHEEHY et al., 2001). Diversos autores relataram também a utilização de enzimas nos processos de extração (LAMBLE; HILL, 1996; PARDO-MARTINEZ et al., 2001; RATTANACHONGKIAT et al., 2004; ACKERMAN et al., 2005; SANZ et al., 2005). A especiação de arsênio empregando agitação com água como solvente foi descrita, com eficiência de extração na faixa de 57 a 81% do arsênio total extraído de amostras de mexilhões, (SOROS et al., 2003). Na comparação de métodos de extração empregando agitação, extração por ultra-som, extração acelerada por solvente e extração por microondas, uma eficiência de 100% foi conseguida na extração aquosa assistida por microondas e de 50% na extração com metanol, entretanto a extrações por agitação e assistida por ultra-som apresentaram eficiências de 30% e 20% para os extratos aquoso e com metanol respectivamente (NARUKAWA et al., 2008). Yuan e colaboradores realizaram uma comparação da eficiência de métodos de extração, empregando cinco tipos diferentes de solvente , estes autores estudaram o rendimento da extração por soxhlet, ultra-som, agitação, e assistida por microondas; a melhor eficiência de extração foi conseguida empregando uma mistura etanol-água, entretanto as menores eficiências foram conseguidas quando empregado metanol puro (YUAN et al., 2005). Mais tarde, Wrobel e colaboradores apresentaram uma revisão de procedimentos para o pre-tratamento de amostras com matrizes complexas visando a especiação de arsênio e selênio (WROBEL; CARUSO, 2005).

2.2.1 Extração enzimática

O emprego de enzimas em química analítica tem, geralmente a finalidade de simular processos biológicos ou digestivos dos organismos vivos. As enzimas são muito utilizadas especialmente para ensaios de biodisponibilidade, seja de elementos tóxicos ou de nutrientes, as enzimas mais comumente utilizadas são as enzimas digestivas como proteases, tripsina, lípase, amilase, por exemplo, a pancreatina, mistura de lípase e amilase pode ser empregada para digerir matrizes pouco homogêneas (SANZ et al., 2007).

Para extração das espécies de arsênio em alimentos para bebês foram avaliadas duas enzimas diferentes, pancreatina e tripsina; embora ambas enzimas tenham apresentado eficiência de extração similares, os extratos em meio de pancreatina apresentaram superposição de picos de arsenobetaina e dimetilarsênio nos cromatogramas (PARDO-MARTINEZ et al., 2001). A extração enzimática com tripsina,de espécies de arsênio em peixes e crustáceos do lago Pak Pa-Nang, um estuário no meio de uma região de mineração no sul da Tailândia, teve eficiência de 82-100% (RATTANACHONGKIAT et al., 2004). A comparação dos métodos enzimáticos e métodos químicos de extração para a especiação de arsênio em farinha de arroz e cinco tipos diferentes de arroz em grão, revelou boa eficiência para ambos os métodos, contudo quando a extração enzimática foi empregada, se evidenciou o aparecimento de um pico não identificado no cromatograma (ACKERMAN et al., 2005). Nam e colaboradores realizaram um estudo da eficiência de diferentes métodos de extração para especiação de arsênio em amostras de alimentos e suplementos alimentares. Os autores concluiram que quando empregada a extração enzimática assistida por ultra-som utilizando α-amilase, a eficiência de extração resultou em 104% para farinha de arroz, 98% para maçã

congelada, entanto que para espinafres a eficiência de extração foi de apenas 7% (NAM et al., 2006).

Recentemente foi descrita a lixiviação continua em linha com cromatografia de intercambio iônico e detecção por ICP-MS para a extração e determinação de espécies de arsênio em alimentos de origem marinha; mediante o bombeamento em seqüência de saliva, suco gástrico e suco intestinal artificiais, através de uma coluna contendo as amostras, 7 espécies de arsênio foram determinadas no extrato de saliva, sendo esta, segundo os autores, responsável pela remoção de quase a totalidade do arsênio biodisponível (DUFAILLY et al., 2008).

A extração enzimática assistida por microondas empregando uma mistura de lipase e pronase E, em meio de tampão fosfato a pH 7,25 e 37°C demonstrou uma eficiência de extração de 82-94% e 57-97% para os matérias de referência DOLT-2 e BCR-627 respectivamente, sem indução aparente de interconversão das espécies (REYES et al., 2009).

Uma revisão sobre métodos de extração in-vitro empregando enzimas gastro-intestinais, métodos conhecidos como biodisponibilidade oral, aplicada a amostras de solo e alimentos foi realizada enfatizando parâmetros como pH, composição das amostras e tamanho de partícula empregado (INTAWONGSE E DEAN, 2006). Mais tarde, Vale e colaboradores apresentam uma revisão e discusão sobre a viabilidade do emprego de extração enzimática assistida por ultra-som (VALE et al., 2008).

2.2.2 Extração por microondas

A extração por microondas encontra-se amplamente difundida em função da eficiência e rapidez no preparo de amostras quando comparada com procedimentos tradicionais. O emprego de baixas potências, entre 20 e 90 W e pressões normais, torna possível a extração de compostos organometálicos sem afetar as estruturas das moléculas extraídas em amostras biológicas e ambientais. No entanto parâmetros como solvente empregado, potência e tempo aplicados precisam ser cuidadosamente avaliados para evitar perda de analitos ou interconversões indesejadas (DIETZ et al., 2007). Nóbrega e colaboradores apresentaram uma completa revisão sobre o emprego de microondas para análise de especiação de estanho, arsênio, mercúrio e selênio em diversas matrizes (NÓBREGA et al., 2002).

Mediante um procedimento desenvolvido para otimização de processos de extração de espécies de arsênio em mexilhões, aplicando uma potência de arredor de 40W, foi conseguida a remoção de 85% do arsênio total nas amostras em menos de 4 minutos (DAGNAC et al., 1998). Mais tarde, Ackley e colaboradores, empregando uma mistura 80:20 de metanol-água e aquecendo a 65°C durante 4 minutos conseguiram a extração de 100% do arsênio no material certificado de referência DORM-2 (ACKLEY et al., 1999).

A extração assistida por microondas de arsenito, arsenato e dimetilarsênio em amostras de farinha de arroz, empregando água como meio de extração e posterior detecção por LC-ICP-MS apresentou uma eficiência de extração de arredor de 100% sem alterações químicas aparentes (NARUKAWA et al., 2008). Estes autores descrevem também um decréscimo de 50% na eficiência de extração quando empregado metanol como meio extrator. Entretanto, foi relatada uma eficiência de 96-105% de extração quando utilizada uma mistura 1:1 metanol-água na extração

assistida por microondas de espécies de arsênio em amostras de camarão e *Mya arenaria* Linnaeus, uma espécie de ostras (Yang et al., 2009).

2.2.3 Extração por ultra-som

A extração assistida por ultra-som, seja por sonda focalizada ou banho de ultra-som, foi primeiramente empregada para determinação de teores totais de elementos químicos. No entanto nos últimos anos ocorreu um aumento no número de publicações que descrevem o emprego da extração assistida por ultra-som, principalmente banho de ultra-som, em estudos de especiação química. O emprego de ultra-som permite uma melhor homogeneização do meio aquoso solvente/soluto das amostras a serem extraídas. Um dos fenômenos mais importantes quando aplicado ultra-som a uma solução aquosa é o fenômeno de cavitação, fenômeno físico que ocorre gerando pequenas bolhas que aumentam seu tamanho para finalmente implodir. Devido a isto, os fenômenos de cavitação são considerados como micro reatores no interior da amostra, onde se atingem temperaturas de arredor dos 5000°C e pressões da ordem das 1000 atmosferas, causando erosão mecânica dos sólidos e ruptura de partículas. Por outro lado, no meio líquido se formam íons que produzem oxidação ou redução das espécies químicas, por exemplo, quando empregada água como solvente em extração por ultra-som, são formados radicais hidroxila além de peróxido de hidrogênio (SANTOS; CAPELO, 2007). Caruso e colaboradores relataram o emprego de extração assistida por ultra-som em amostras de maçã com uma mistura metanol-água (50:50), a extração em banho de ultra-som durante 6 horas apresentou porcentagens de recuperação de 72 a 97% para três tipos diferentes de amostras, entretanto, a extração foi melhorada

consideravelmente (81 a 104%) quando as amostras foram tratadas com α-amilase prévio à extração em banho de ultra-som (CARUSO et al., 2001).

A eficiência do ultra-som para extração de espécies de arsênio em ostras, empregando diferentes solventes, água, metanol-água (50:50) e metanol foi avaliada. O procedimento consistiu em submeter uma porção da amostra a duas extrações consecutivas de uma hora cada em banho de ultra-som, o sobrenadante resultante foi misturado e em seguida evaporado em rotoevaporador a temperatura ambiente e finalmente o volume restituído com água deionizada. Independentemente do solvente empregado, somente 53% do arsênio total foi extraído, no entanto o perfil cromatográfico não apresentou diferenças dependentes do solvente empregado (MCSHEEHY et al., 2001).

Uma eficiência de extração de 102% para amostras de camarão e, de 96% para o material certificado de referência DORM-2 foi conseguido empregando uma mistura 50:50 metanol-água como solvente. Nessa pesquisa a mesma alíquota da amostra foi submetida a três extrações de 30 minutos cada uma no banho de ultra-som. Os extratos foram analisados por LC-ICP-MS (MILSTEIN et al., 2003), segundo estes autores, variações na composição e pH do solvente não apresentaram melhoras significativas na eficiência de extração. Estudos de estabilidade das espécies durante o processo de extração com metanol-água e metanol-cloroformo-água não apresentaram degradação das seis espécies adicionadas. Contudo,quando empregada uma mistura tripsina-carbonato de amônia verificou-se a oxidação de arsenito para arsenato. A mistura metanol-água apresentou melhor eficiência de extração que a mistura metanol-clorofomio-água para as seis espécies adicionadas.

Wahlen e colaboradores, relatam excelente recuperação de arsenobetaina em materiais certificados de referência, DORM-2, DOLT-2 e TORT-2, empregando água como solvente previa agitação por 10 minutos, extração em banho de ultra-som à temperatura do laboratório (24-26°C) durante 20 minutos e posterior centrifugação, no entanto apresentam diferenças na extração de dimetilarsênio DMA (WAHLEN et al., 2004). Para especiação de arsênio em algas provenientes da região antártica, a extração em banho de ultra-som com uma mistura metanol-água (50:50) durante duas horas a 30°C foi conseguida com eficiência na faixa de 83 a 108% para arsênio total (WUILLOUD et al., 2006).

2.3 Procedimentos de preservação das espécies de As em solução

Como já mencionado, a estabilidade das espécies resulta ser um ponto crucial em análises de especiação, entretanto esta estabilidade depende não só das metodologias de extração, como também das estratégias de amostragem e preservação tanto das amostras como dos extratos finais até o momento da análise.

Em 1999 Feldman e colaboradores realizaram um estudo da estabilidade de arsenito, arsenato, MMA, DMA e arsenobetaina em urina. Para isto, as soluções decorrentes da reconstituição da urina liofilizada foram armazenadas em diferentes condições de temperatura, luminosidade, com ou sem emprego de ácidos e conservantes. Empregando material de referência certificado (Toxic Metals in Freeze-Dried Urine SRM 2670) e amostras de urina de vários voluntários, estes autores estudaram o efeito da adição de HCl até 0,1 mol L^{-1}, estocando as soluções a -20°C, 4°C e 25°C. Nestas mesmas temperaturas foi estudado também o efeito de possíveis conservantes como azida sódica, ácido benzóico, cloreto de

benziltrimetilamonia e cloreto de cetilpiridina. As soluções com os diferentes aditivos estudados foram estocadas por períodos de 1, 2, 4 e 8 meses. Segundo estes autores as soluções sem conservantes podem ser armazenadas por um período de até 2 meses a temperaturas dentre -20 e 4 °C sem que se verifiquem mudanças na distribuição das espécies nas amostras estudadas. A adição de conservantes não ofereceu benefícios aparentes no intuito de conservação das espécies; no entanto as soluções acidificadas com HCl apresentaram processos de degradação afetando a recuperação das espécies estudadas. A arsenobetaina demonstrou alta estabilidade nas soluções estocadas por até 8 meses sem o emprego de conservantes, verificando-se em alguns casos o aparecimento de até 6 e 2% de DMA e MMA respectivamente (FELDMANN et al., 1999).

A estabilidade de arsenito, arsenato, ácido monometilrasônico, ácido dimetilarsínico, ácido fenilarsônico, selenito, selenato, selenometionina, antimonito, antimonato e telurato em água, urina (NIST SRM 2670n), extrato de peixe (DORM-2) e material de referência certificado de solo (NIST SRM 2710), armazenadas a - diferentes temperaturas foi descrita (LINDEMANN et al., 2000). Quando armazenadas a -20°C por um período de 30 dias as soluções aquosas apresentaram um considerável decréscimo nas concentrações de arsenito, selenito, selenometionina e antimonito, assim como a aparição de uma nova espécie de selênio. A estocagem destas soluções a +20°C apresentou maior estabilidade para as espécies estudadas, embora tenha ocorrido o aparecimento de uma nova espécie de selênio em quantidades mínimas após 30 dias.

O material de que estão constituídos os recipientes em que serão armazenadas as amostras joga um papel preponderante na estabilidade das espécies. Um estudo revelou a contaminação com arsênio da água Milli-Q

armazenada em frascos de vidro previamente incubados em uma solução 10% de ácido nítrico. Os autores atribuíram à provável lixiviação em presença do ácido, uma vez que As_2O é utilizado na industria do vidro (HUANG; ILGEN, 2004). Estes autores também relatam a adsorção de arredor de 5% de todas as espécies adicionadas nos diferentes matérias dos frascos armazenados a 5°C, entanto que o DMA apresentou maior grau de adsorção. Os mesmos testes realizados a 20°C apresentaram resultados similares, embora neste caso se evidenciou um considerável grau de oxidação do arsenito para arsenato.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Reagentes, soluções e equipamentos.

- ✓ Soluções estoque das diferentes espécies de arsênio estudadas neste trabalho, preparadas e armazenadas em geladeira em frascos de cor âmbar.
    1. Arsenito (As^{3+}), $AsNaO_2$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
    2. Arsenato (As^{5+}), $AsNa_2HO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
    3. Monometilarsênio (MMA) (Supelco, Sigma-Aldrich, USA)
    4. Dimetilarsênio (DMA) (Supelco, Sigma-Aldrich, USA)
    5. Arsenobetaina (AsB) preparado à partir do material de referência certificado BCR-626.
- ✓ Amostras de camarão seco, adquirido em comércios locais.
- ✓ Amostras de tubarão, cedidas pelo professor José Ferreira.
- ✓ Material certificado de referência para elementos traço (DORM-2), com teores certificados para:
    1. arsênio total igual a 18 ± 1,1 mg/Kg

2. arsenobetaina igual a 16,4 ± 1,1 mg/Kg e,
3. Ìon tetrametilarsônio igual a 0,248 ± 0,054 mg/Kg.

- ✓ Ácido nítrico concentrado, destilado, e peróxido de hidrogênio 30 % v/v, (Merck, Darmstadt, Alemanha), empregados para realizar as digestões nitrico-peróxido das amostras e materiais de referência certificado.
- ✓ Banho de ultra-som de 40 kHz (Thornton, Nova Técnica, Piracicaba-SP, Brasil)
- ✓ Bloco de digestão (Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) e, tubos de digestão de 25 ml.

Para todos os experimentos realizados durante este trabalho, se usou material previamente descontaminados em banhos contendo 10 % (vv^{-1}) de HNO_3 por 24 horas. Água de deionizada, purificada em sistema Milli-Q com uma resistividade de 18.2 MΩ .cm (Millipore, Bedford, MA, USA), foi empregada no preparo de todas as soluções.

2.4.2 Procedimentos de extração

Uma vez realizada uma minuciosa recopilação de dados sobre diferentes metodologias reportadas para a extração de espécies de arsênio em diferentes matrizes, se resolveu avaliar e subseqüentemente adotar como método de extração para este trabalho, aqueles que estiverem em assentimento com a química limpa. Por tanto foi escolhido como método de extração para esta pesquisa, a extração em banho de ultra-som empregando como solvente apenas água ou, em ocasiões, uma mistura metanol-água em proporção 20:80.

A eficiência da extração determinou-se pela relação percentual do teor de arsênio total nas soluções digeridas e nas soluções extraídas em banho de ultra-som. O procedimento de extração consistiu em pesar 0,25 g do material de referência certificado DORM-2, agregou-se 20 mL de água ultra pura e se submeteu à extração em banho de ultra-som por intervalo de uma hora. Para a determinação do teor total de arsênio foi realizada digestão nítrico-peróxido (HNO_3 + H_2O_2). Para tal, pesaram-se 0,25 g do material de referência e se adicionou 4 mL de ácido nítrico, deixou-se esta mistura em repouso por 2 horas, ao cabo deste tempo se adicionou 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% e se levou a mistura a 50°C durante 24h em bloco digestor. Em seguida deixaram-se estas soluções em repouso a temperatura ambiente até esfriar, quando então foi completado o volume e filtrou-se em filtro de acetato de celulose de 0,45 μm de porosidade. Para a determinação de arsênio total, foi realizada a redução das espécies para arsenito, para tal fim, se tomou 5 mL de cada solução, extraídas e digeridas, se adicionou 0,5 mL de uma solução 50% m/v KI e 10% m/v de ácido ascórbico e as determinações foram realizadas por espectrometria de fluorescência atômica.

Uma vez determinada a eficiência da metodologia de extração empregada, se procedeu a investigar a estabilidade de espécies durante o procedimento de extração. Para tal se realizaram dois procedimentos, primeiro se pesaram 0,25 g do material de referência, ao qual se adicionou quantidade suficiente de cada uma das espécies para atingir concentrações na solução final iguais a 12, 12, 16 e 15 μg/L, de mono e dimetilarsênio, arsenito e arsenato respectivamente. Esta mistura foi deixada em repouso durante duas horas quando finalmente se completou o volume e se submeteu ao procedimento de extração. Por outro lado, se preparou uma solução padrão contendo estas mesmas concentrações de cada espécie, logo

ambas as soluções foram submetidas à extração por ultra-som em tempos de 15, 30, e 60 minutos. Alternativamente, o mesmo procedimento de extração foi realizado, empregando como solvente uma mistura metanol-água em uma proporção 20:80.

As análises posteriores a este procedimento levaram-se a cabo empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração dos hidretos voláteis na interface. Finalmente estes mesmos procedimentos foram aplicados às amostras de interesse nesta pesquisa visando à identificação e quantificação das espécies de arsênio presente nas amostras.

O monitoramento da decomposição da amostra de camarão e, o possível aparecimento de espécies tóxicas ao longo do tempo também foi realizado. O procedimento consistiu em pesar 250 g de camarão e, na seqüência cortar em pequenos pedaços, deixando logo decompor ao ar em capela de fluxo laminar. Diariamente se tomaram três sub-amostras, as quais foram moídas e submetidas aos procedimentos de extração descritos acima.

2.4.3 Conservação das amostras e dos extratos

As amostras de camarão seco foram liofilizadas, moídas em moinho criogênico e posteriormente armazenadas em geladeira.

Os extratos, assim como também as soluções resultantes da digestão das amostras e as soluções padrão mistas e individuais foram conservadas em geladeira a 4°C, sem adição de quaisquer conservantes. Semanalmente se realizou a análise destas soluções com a finalidade de avaliar a estabilidade das mesmas sob estas condições.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Eficiência do método de extração

Resultados obtidos das experiências realizadas para a determinação da eficiência do método de extração em termos de arsênio total extraído apresentam-se na Figura 2.1. Como pode ser observado nesta figura, o método empregado atingiu uma eficiência de extração maior do que 78%, eficiência maior do que os 53% relatados anteriormente por McSheehy e colaboradores para 2h de extração (MCSHEEHY et al., 2001). Entretanto, em uma hora de extração, estes resultados se equiparam aos resultados obtidos anteriormente por Caruso e colaboradores empregando 6h de tratamento com uma mistura metanol-água (CARUSO et al., 2001). Embora já tenha sido relatada uma eficiência de extração de 102% (MILSTEIN et al., 2003), estes autores empregaram uma mistura metanol-água (50:50) sem posterior evaporação do solvente e, como veremos posteriormente, ocorre interferência na detecção por fluorescência atômica provocada pela presença do metanol nos extratos.

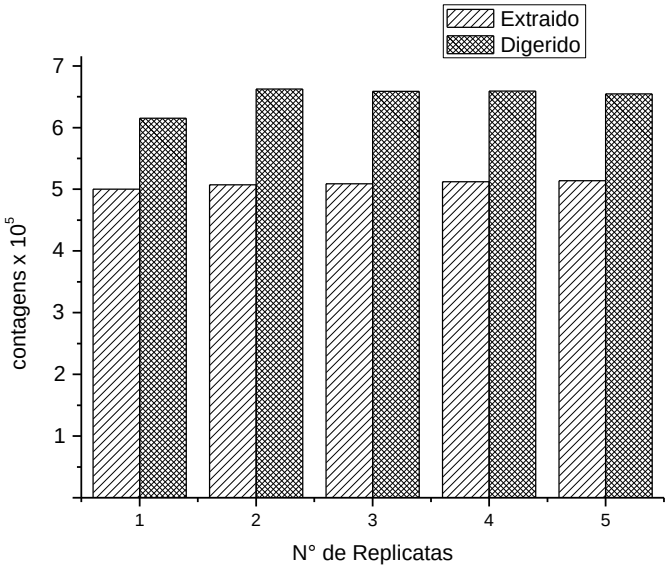


Figura 2.1 – Eficiência do método de extração de As por ultra-som. Apresentam-se os teores totais em 5 repetições da extração aquosa e dos extratos obtidos por digestão total. Validação do método utilizando Material Certificado de Referência Dorm-2.

2.5.2 Interconversão de espécies

Para os estudos de possíveis interconversões entre as espécie durante o procedimento de extração, se preparou uma solução padrão contendo 15 μg/L de arsenito, arsenato, monometil e dimetil arsênio. Esta solução foi então submetida ao procedimento de extração em banho de ultrassom, alíquotas de 500 μL foram amostradas a intervalos de 15, 30 e 60 minutos. Os resultados deste procedimento se apresentam na Figura 2.2.

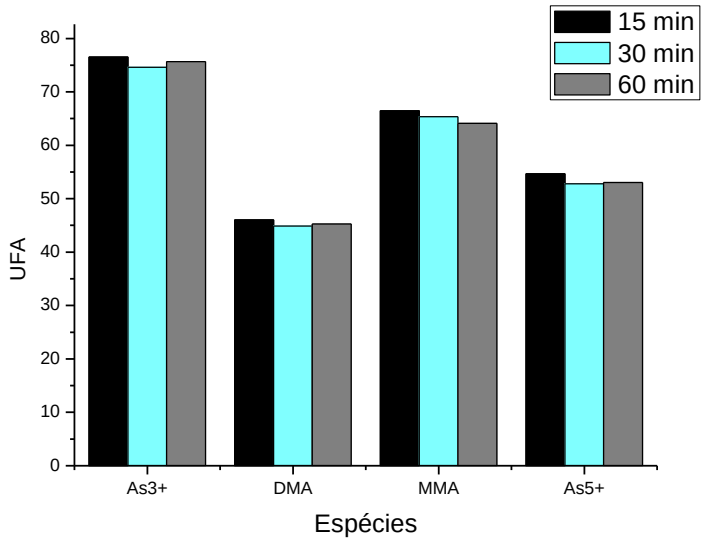


Figura 2.2 – Estabilidade das espécies de arsênio durante o procedimento de extração em banho de ultra-som. Análise das soluções após 15, 30 e 60 minutos de duração do procedimento aplicado. Os desvios para arsenito, arsenato, monometilarsênio e dimetilarsênio foram de 0,96; 0,99; 1,17 e 0,59 respectivamente.

Como podemos observar, não houve variações significativas nas concentrações das espécies ao longo do procedimento de extração, resultados em consonância com os já relatados para a extração de espécies de arsênio em ostras (MCSHEEHY et al., 2001).

2.5.3 Interferências nas análises dos extratos

Uma interferência no cromatograma no tempo de retenção correspondente ao monometilarsênio e dimetilarsênio foi observada como mostrado no cromatograma da Figura 2.3. quando se empregou mistura 20:80 de metanol-água como solvente nos procedimentos de extração em banho de ultra-som.

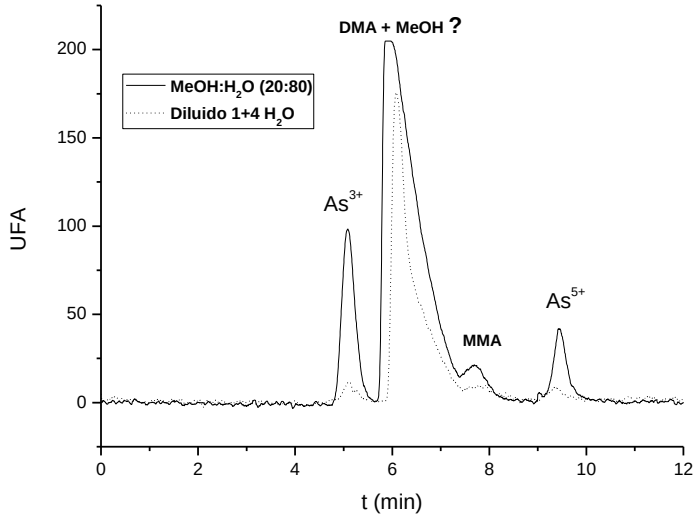


Figura 2.3 – Cromatograma das espécies de As em amostra de camarão. Extrato de camarão adicionado com arsenito, arsenato, monometilarsênio e dimetilarsênio, extraídos em banho de ultra-som durante uma hora com a mistura 20:80 metanol-água.

Os procedimentos de extração descritos na literatura, que empregam diferentes proporções metanol-água, normalmente propõem a evaporação da solução extratora antes de aferir com água para o volume desejado (HEITKEMPER et al., 2001; VAN HULLE et al., 2002). Entretanto, isto implicaria acrescentar um passo a mais no preparo de amostras, com a conseqüente possibilidade de mais erros introduzidos nas determinações finais. Outros autores também empregaram mistura metanol-água, para a extração por ultra-som, embora a evaporação do solvente e reconstituição do volume não foi aplicado (MILSTEIN et al., 2003). No entanto Nam e colaboradores advertem sobre o incremento do sinal de arsênio com o incremento da proporção de metanol nos extratos quando analisados por ICP-MS (NAM et al., 2010).

2.5.4 Estabilidade das espécies em solução e dos extratos

Análises semanais das soluções padrão e dos extratos, armazenados em geladeira a 4°C, sem adição de conservantes, revelaram a degradação das espécies metiladas. Transcorridas três semanas, as soluções individuais de monometilarsênio e dimetilarsênio mostraram quase completa degradação para As^{5+}, entanto que as soluções padrão de arsenito mostraram uma oxidação para arsenato ao longo deste mesmo período . No percurso de 2 meses todas as soluções padrão individuais apresentaram mais de 90% de arsenato. Nas soluções padrão multiespécies, este comportamento se verificou em tempos menores aos das soluções individuais, evidenciando-se a quase completa oxidação das espécies para arsenato em um mês (Figura 2.4). Em extratos de tecidos de frango foram relatadas por Pizarro e colaboradores a oxidação do arsenito para arsenato. entretanto descrevem uma boa estabilidade das espécies metiladas nos extratos por até 3 meses. Em extratos de tecidos de frango houve degradação de arsenobetaina para DMA após dois meses; enquanto que nos extratos de peixes foi detectada a conversão de arsenobetaina para uma espécie não reconhecida (PIZARRO et al., 2003).

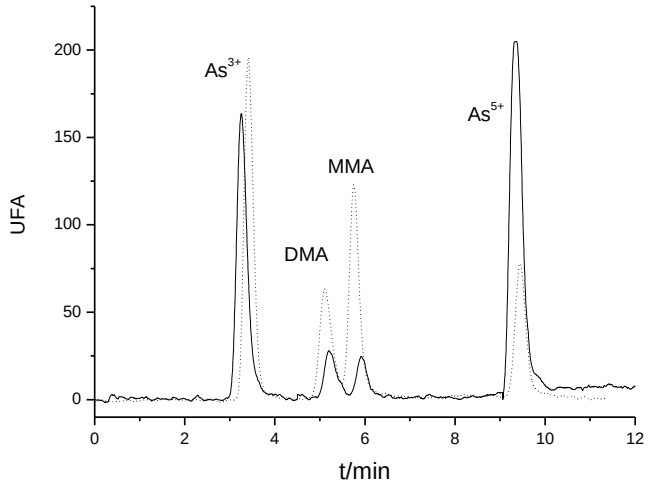


Figura 2.4 – Estabilidade das espécies em solução. Degradação das espécies em soluções padrão armazenadas ema geladeira. Línea pontilhada = solução preparada no dia. Linea sólida = cromatograma após 3 semanas.

Os extratos das amostras de camarão e tecido de tubarão, assim como as soluções resultantes da digestão total, submetidas ao mesmo procedimento de armazenagem que as soluções padrão, e sem adição de preservativos, apresentaram o aparecimento de fungos ao cabo de três semanas. Estes resultados apresentam ligeira semelhança com resultados apresentados anteriormente (LINDEMANN et al., 2000) ao estudar a estabilidade de espécies de arsênio, selênio e antimônio. Estes autores relataram um leve decréscimo na concentração das espécies de arsênio após 30 dias quando armazenadas as soluções a +3°C e, a -20°C; conjuntamente com o decréscimo na concentração de arsenito se observou um aumento na concentração de arsenato. Entretanto, estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Feldman e colaboradores, os quais descrevem a conservação das espécies e dos extratos por um tempo de até 2 meses a 4°C e -20°C (FELDMANN et al., 1999).

2.5.5 Espécies tóxicas na decomposição natural da amostra de camarão

O experimento para monitorar a possível aparição de espécies tóxicas durante o armazenamento das amostras de camarão deixando-as em contato com o ar, não evidenciou degradação da arsenobetaina nem aparecimento de novas espécies. Quando os extratos foram analisados por eletroforese capilar ou cromatografia líquida, após diferentes períodos de amostragem não foi detectada nenhuma modificação.

2.6 Conclusões

O método de extração por banho de ultra-som apresenta satisfatória eficiência na extração total de arsênio (>78%) para análise de especiação em amostras de tubarão e camarão.

As espécies de arsênio estudadas se mantiveram estáveis durante o procedimento de extração por ultra-som, sem que se verifiquem alterações das proporções entre as espécies, tanto em soluções padrão como nos extratos contaminados com as espécies estudadas. Por tanto a extração por ultra-som pode ser aplicada em análises de especiação em amostras biológicas, com boa eficiência de extração mantendo-se a estabilidade das espécies extraídas.

As amostras de camarão seco se mantiveram estáveis ao longo de três meses ao ar livre, no percurso deste período não foi detectado aparecimento de espécies tóxicas. Entretanto o armazenamento de soluções padrão e dos extratos das amostras, em geladeira a +4°C foi eficiente por um curto período, por tanto

torna-se altamente recomendável realizar as análises imediatamente depois das extrações.

Por ultimo a extração aquosa em banho de ultra-som resultou ser eficiente e não apresentou interferências nas determinações por espectrometria de fluorescência atômica. Entretanto quando empregado 20% de metanol no processo de extração houve severas interferências nos cromatogramas nos tempos de retenção de dimetil e monometilarsênio. Por tanto a evaporação dos solventes para posterior reconstituição de volume com água após a extração, se torna recomendável para análises por AFS.

3 Especiação de As por Eletroforese Capilar Acoplada a Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma

Resumo

Neste capítulo se apresentam os fundamentos para a separação e determinação de arsenito, arsenato, monometilarsênio, dimetilarsênio e arsenobetaina em amostras de camarão empregando eletroforese capilar. Também foi desenvolvido um dispositivo construído em acrílico com um encaixe hermético para microtubos de 200 μL empregados como recipientes para a injeção hidrodinâmica no do capilar eletroforético adaptado a sistema caseiro de eletroforese capilar projetado no Laboratório de Química Analítica do CENA-USP. Apresentam-se também neste capítulo, o acoplamento do sistema caseiro de eletroforese capilar com sistema de nebulização de alta eficiência para introdução da amostra espectrômetro de massas com fonte de plasma ICP-MS. O acoplamento CE-HG-ICP-MS foi também empregado para determinação de espécies de arsênio em amostras de urina liofilizada.

Abstract

In this chapter are presented fundamentals for separation and determination of arsenite, arsenate, monomethylarsinic acid, dimethylarsonic acid and arsenobetaine fro shrimp by capillary electrophoresis system. A time controlled hydrodynamic injector devise employing 200 μL micro-tubes as recipient for samples and electrolyte was developed for coupling with a “home-made” capillary electrophoresis system.

A high efficiency nebulizer (HEN) was also employed for the coupling of capillary electrophoresis system to an inductively coupled plasma mass spectrometer. Hydride generation was also employed as interface derivatization for determination of arsenic species in lyophilized urine samples by CE-HG-ICP-MS.

3.1 Introdução

A eletroforese capilar é um método de separação, baseado na migração diferenciada pelas diferenças na razão carga/tamanho (*z/m*) de espécies iônicas ou ionizáveis através de um campo elétrico, gerado pela aplicação de uma diferença de potencial (ddp) entre os extremos de um tubo capilar contendo uma solução eletrolítica. A separação destas espécies se verifica pela ação conjunta da migração eletrocinética e do fluxo eletroosmótico, produzidos como conseqüência do campo elétrico gerado no interior do capilar e, da movimentação dos cátions da solução eletrolítica nas proximidades das paredes do capilar que carregam entre si moléculas de água, provocando o que se conhece como fluxo eletroosmótico. Devido à existência deste fluxo eletroosmótico (EOF: do inglês eletroosmotic flow) torna-se possível realizar a determinação de moléculas aniônicas, catiônicas e, sob determinadas condições também neutras, numa única separação eletroforética. Leituras recomendadas sobre os fundamentos e implicações em eletroforese capilar podemos encontrar em (TAVARES, 1996; 1997; DE MORAES et al., 2009), como assim também muitas outras publicações que abordam experiências realizadas para o entendimento desta técnica que reportam resultados de estudos realizados com diferentes parâmetros implicados na eletroforese capilar e que devem ser levados em consideração na hora de montar quaisquer experimentos empregando esta técnica de separação (ATAMNA et al., 1990a; 1990b; ISSAQ et al., 1990; RASMUSSEN; MCNAIR, 1990; ZHU et al., 1994; BELLO, 1996; MACKA et al., 1998; STOYANOV; PAWLISZYN, 2004).

Esta técnica tem se mostrado como uma ferramenta seletiva e sensível na especiação de íons metálicos. Sua relativa simplicidade, seu baixo consumo de

amostras e reagentes, baixo custo (as colunas capilares são mais baratas que as cromatográficas), assim como a possibilidade de separar espécies aniônicas e catiônicas num mesmo sentido e, em reduzidos tempos de análise, têm feito da eletroforese capilar uma das técnicas de preferência em estudos de especiação.

A eletroforese capilar tem se mostrado ao longo dos últimos anos como uma técnica de separação robusta e versátil, empregada em química analítica para separação tanto de espécies iônicas como neutras. O emprego de capilares com diâmetros internos pequeníssimos (da ordem de alguns micrômetros) permite uma eficiente dissipação do calor e suprime efeitos de convecção no interior do capilar, ao mesmo tempo em que permite a aplicação de altas voltagens sem incorrer em correntes elétricas muito elevadas, minimizando assim os efeitos de aquecimento, ao longo do tempo, da solução no interior do capilar. A combinação destas propriedades confere à eletroforese capilar uma alta eficiência de separação, da ordem de 10^5-10^6 platôs teóricos em um curto período de tempo (MORIN et al., 1992).

A eletroforese capilar em zona (CZE: do inglês capillary zone electrophoresis) foi utilizada para a determinação de seis espécies de arsênio com detecção UV (VAN DEN BROECK; VANDECASTEELE, 1998), conseguindo-se a separação e detecção de As(III), As(V), MMA, DMA, arsenobetaina e arsenocolina, em um tempo inferior a 10 minutos, em concentrações de 100 μg/L. No ano de 2003 foi reportada a separação de As(III), As(V), MMA, DMA e outros quatro ácidos orgânicos (SUN et al., 2003), empregando-se detecção por UV em 192 nm; estes autores reportaram também a determinação simultânea de As(III), As(V), MMA, DMA, Se(IV), Se(VI), selenocisteína (SeC), selenometionina (SeM) e selenocistamina (SeCM), utilizando tampão fosfato 15 mmol/l e detecção UV em 195 e 200 nm para as espécies de

arsênio e selênio respectivamente (SUN et al., 2004). A separação e detecção de seis espécies de arsênio utilizando um acoplamento CE-ICP-MS foi relatado (MICHALKE; SCHRAMEL, 1998), conseguindo limites de detecção de 15 μg/L para As(III), MMA, DMA e As(V), e 65 μg/L para arsenobetaína e arsenocolina. A separação destas mesmas espécies foi conseguida mais tarde mediante o acoplamento CE-ICP-MS (VAN HOLDERBEKE et al., 1999), atingindo-se limites de detecção de 1-2 μg/L.

Embora a maioria dos trabalhos citados refere-se à determinação das espécies orgânicas e inorgânicas em água, neste trabalho será estudada a possibilidade de utilização desta técnica para a separação de espécies de arsênio nos extratos de amostras biológicas. Por outra parte a possibilidade de separação e detecção de espécies aniônicas, catiônicas e neutras num mesmo sentido de análise, decorrente da ação do fluxo eletroosmótico, permite a simplificação do sistema, comparado com a utilização de colunas aniônicas e catiônicas no caso da cromatografia líquida.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Reagentes, soluções e equipamentos

- ✓ Soluções estoque de fosfato monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) de sódio em concentração 1 mol/L cada uma (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Brometo de tetradecil trimetilamônio (TTAB) empregado como modificador de fluxo eletosmótico (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Ácido fosfórico empregado para o ajuste do pH dos tampões de trabalho, (Merck, Darmstadt, Alemanha).

- ✓ Ácido Nítrico destilado (HNO_3), para ser empregado como solução eletrolítica auxiliar nos sistemas CE-ICP e também para acidificação em linha das soluções efluentes do capilar eletroforético, nos sistemas CE-HG-ICP (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Tetrahidroborato de sódio ($NaBH_4$) para a reação de geração dos hidretos voláteis (Nuclear, CAQ Casa da Química Ind. e.Com.Ltda., Diadema-SP, Brasil)
- ✓ Capilares de sílica fundida de 75 mm de diametro interno i.d.(Polymicro Technologies, EUA)
- ✓ Tubos Eppendorf® de 200 μL de volume interno aferido. (MPL materiais para laboratório, Piracicaba-SP, Brasil)
- ✓ Fios de platina de 0,3 mm de espessura (Loccus Brasil, São Paulo)
- ✓ Bomba de seringa (Shimadzu Corporation, Kyoto-Japão).
- ✓ Unidade controladora de gás (Shimadzu Corporation, Kyoto-Japão) e um cilindro de gás argônio qualidade analítica (Oxipira, Piracicaba-SP, Brasil
- ✓ Válvulas solenóide de três vias NR161T031, (NResearch and Development Incorporated).
- ✓ Fonte de alta voltagem modelo CZE 1000R (Spellmam, EUA)
- ✓ Detector UV/Visível LabAlliance com a interface para aquisição de dados conectada a um computador 486 provido com interface e programa de aquisição cromatográfica CSW 1.7 (Data Apex Ltda.) funcionando em sistema operativo *Windows*®
- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução com plasma acoplado indutivamente (HR-ICP-SFMS) (Finnigan modelo Element)

- ✓ Nebulizador de alta eficiência, HEN (High-Efficiency Nebulizer), (Meinhard, Santa Ana, CA, USA)
- ✓ Câmara de separação de fases para geração de hidretos, construída no laboratório segundo (SUÁREZ; GINÉ, 2005).

Todos os reagentes utilizados para as análises por eletroforese capilar e por cromatografia líquida foram de grau analítico. As respectivas diluições levaram-se à cabo empregando água deionizada purificada em sistema Milli-Q com uma resistividade de 18.2 MΩ .cm (Millipore, Bedford, MA, USA), filtradas em filtro de acetato de celulose de 0,2 mm de porosidade, previo às análises realizadas.

3.3 Desenvolvimento Experimental

Os mecanismos de separação implicados na eletroforese capilar dependem das diferenças na mobilidade eletroforética das espécies em solução, esta propriedade tem estreita relação com as diferenças estruturais de cada soluto, como por exemplo, seu tamanho, forma ou carga iônica; as quais por sua vez estarão relacionadas às propriedades físico-químicas do tampão eletroforético empregado, como pH, força iônica, viscosidade e constante dielétrica, dentre outras. Entretanto a temperatura afeta diretamente estas propriedades da solução eletrolítica e conseqüentemente a separação eletroforética, um controle adequado da temperatura implicará na melhor reprodutibilidade das separações eletroforéticas (MORIN et al., 1992). Estes autores apresentaram uma detalhada análise da influência da modificação de parâmetros como pH, temperatura e voltagem aplicada na modificação do fluxo eletroosmótico, da carga iônica de quatro espécies de

arsênio, assim como de suas respectivas mobilidades eletroforéticas. Na Tabela 3.1 se apresentam algumas das espécies de arsênio encontradas comumente em amostras biológicas e ambientais com suas respectivas estruturas químicas, pKa, nome e abreviaturas empregadas na literatura.

Tabela 3.1 – Pka's de espécies de arsênio. Apresentam-se os pka's conhecidos das espécies de arsênio em sistemas biológicos e ambientais Adaptado de (Larsen, 1998; Le, Lu *et al.*, 2004; Sun, Macka *et al.*, 2004; Wu e Ho, 2004; Kitagawa, Shiomi *et al.*, 2006; Jaafar, Irwan *et al.*, 2007). *R corresponde às diferentes estruturas de açúcares ligados ao arsênio.

Nome	Abreviação	Formula química	Pka
Arsenito, ácido arsinoso	As^{III}	$As(OH)_3$	9,2 – 12,1
Arsenato, ácido arsínico	As^{V}	$AsO(OH)_3$	2,25 - 6,77 - 11,60
Ácido monometilarsínico	MMA^{V}	$CH_3AsO(OH)_2$	3,6 – 8,2
Ácido dimetilarsínico	DMA^{V}	$(CH_3)_2AsO(OH)$	1,3 – 6,2
Óxido de trimetilarsina	TMAO	$(CH_3)_3AsO$	3,6
Arsenobetaina	AsB	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$	2,1
Roxarsone	Roxarsone	$(OH)NO_2PhAs(OH)_2O$	3,5
Ácido fenilarsônico	PAA	$PhAs(OH)_2O$	3,6 – 8,8
p-aminobenzenoarsonato	PABA	$NH_2PhAs(OH)_2O$	1,9 (NH_3^+); 4,1; 9,2

As espécies orgânicas e inorgânicas de arsênio são espécies ácidas que, sob condições normais, não se apresentam como totalmente dissociadas. O grau de dissociação destes ácidos, o qual apresenta uma relação direta com a carga iônica dos mesmos em solução e, influencia diametralmente as suas mobilidades eletroforéticas, depende de seus respectivos pK assim como do pH da solução tampão utilizada como eletrólito. Os capilares de sílica fundida, normalmente empregados em eletroforese capilar, possuem cargas negativas na superfície de sua parede interna, devido à presença dos grupos silanois (SiO^-H^+) e, quando aplicada

uma voltagem positiva, por efeito do fluxo eletroosmótico ocorrerá a movimentação das formas não dissociadas das espécie de arsênio em direção ao cátodo, em seqüência ocorrerá a migração das espécies negativas parcialmente dissociadas (GASPAR et al., 2000). Sob estas condições, unicamente as espécies aniônicas que apresentem mobilidade eletroforética inferior à velocidade do fluxo eletroosmótico poderão ser observadas nos eletroferogramas. Contudo, um incremento do pH da solução eletrolítica, embora implique um incremento do fluxo eletroosmótico, aumentará também a mobilidade eletroforética das espécies de arsênio, devido a um maior grau de dissociação. Entretanto a direção do fluxo eletroosmótico foi revertida empregando uma voltagem negativa assim como também, por adição de um modificador de fluxo, se obteve um menor tempo da análise. Estes autores conseguiram a separação de 6 espécies de arsênio adicionando brometo de cetiltrimetilamônia (cetyltrimethylammonium bromide CTAB) ao tampão eletroforético (50 mmol/L borato, 0,5 mmol/L CTAB, pH 9,3). (Gaspar, Sogor *et al.*, 2000). Na Tabela 3.2 apresenta-se uma resenha de alguns artigos publicados no campo da especiação de arsênio com eletroforese capilar, nesta tabela se descreve o tampão e o modificador de fluxo empregado (caso utilizado), pH, tempo de análise e ordem de aparecimento dos respectivos picos no eletroferograma.

Tabela 3.2 – Recopilação de trabalhos que empregaram eletroforese capilar para a separação de espécies de arsênio, se indica nesta tabela o tipo e pH do tampão empregado, modificador de fluxo caso utilizado, voltagem aplicada, tempo de análise e espécies separadas(*) indicando a ordem de aparecimento das espécies nos respectivos eletroferogramas.

Tampão (concentração)	Modif. De fluxo (concentração)	pH	Voltagem aplicada (kV)	Espécies separadas(*)	Tempo (min)	Referência
Fosfato (25 mmol/L)	**********	5,6	20/30	As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+},	20/12	(MORIN et al., 1992)
NaH_2P0_4+$Na_2B_40_7$ (0,075+0,025) mol/L	**********	7,8	20	As^{3+}, DMA, As^{5+}	12	(LI; LI, 1995)
Ac. piromelítico, NaOH, trietanolamina, hexamethonioOH (2,3-6,5-1,6-0,75) mmol/L	**********	7,7	-30	As^{5+}, As^{3+}, MMA, DMA	< 25	(LIU et al., 1995)
H_3PO_4 + NaOH	**********	3-13	15	Tio e oxotioarsenatos	30	(SCHWEDT; RIECKHOFF, 1996)
Fosfato (15 mmol/L)	SDS[1] (10 mmol/L)	6,5	??????	As^{3+}, APAO, PAO, DMA, DPAA, APAA, PAA, MMA, As^{5+}, PAS.	16	(GRESCHONIG et al., 1998)
Na_2HPO,/NaH_2PO (20 mmol/L)	**********	5,6		As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}, AsC, ASB.	2	(MICHALKE; SCHRAMEL, 1998)
Fosfato 15 mmol/L	**********	6,5	10	As^{3+}, DMA, PABA, PAA, As^{5+}	< 20	(GIL et al., 1999)
Borato (50 mmol/L)	OFM-OH (Waters)	9,4	-25	As^{5+}, MMA, DMA, As^{3+}, AsB, AsC.	10	(VAN HOLDERBEKE et al., 1999)
Cromato 5 mmol/L	OFM Anion-BT (Waters)	11 10	25	As^{5+}, As^{3+}, DMA As^{5+}, DMA, As^{3+}	4 6	(NAIDU et al., 2000)
Fosfato + Borato (20 + 10) mmol/L	**********	9,28	+20	As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}	20	(ZHANG et al., 2001)
Cromato de sódio 0,5 mmol/L	TTAB[2] 0,5 mmol/L	11,2	-20	As^{5+}, MMA, As^{3+}, DMA	< 10	(CASIOT et al., 2002)
H3BO3 16 mmol/L (pH ajust.NaOH)	**********	9,3	30	AsC, AsB, As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}	6	(KOELLENSPERGER et al., 2002)
NaHCO3-Na2CO3 (20 mmol/L)	PDDAC[3]	10	-25	PAO DMA; As^{3+}, p-ASA, NPAA, PAA, MMA, Roxarsone, As^{5+}.	12	(SUN et al., 2002)
Fosfato (20 mmol/L)	**********	6,5	+20	As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}	12	(YIN et al., 2002)
Bicarbonato (2 mmol/L)	Fluoresceina (10^{-7} mol/L)	9,28	+20	As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}	6	(ZHANG et al., 2002)
NaHCO3-Na2CO3 (50 mmol/L)	Co-EOF NSM stacking	10	-25	As^{5+}, Roxarsone, MMA, PAA, 4-NPAA, *p*-ASA, As^{3+}, DMA;	< 8	(SUN et al., 2003)

[1] Sodium Dodecylsulfate,
[2] Trimethyltetradecylammonium bromide
[3] poly(diallydimethylammoniumchloride)

Borato + cromato (12,5 + 10) mmol/L	CTAB[4] (0,5 mmol/L)	9,4	-25	As^{5+}, As^{3+}, MMA, DMA.	< 15	(WU; HO, 2004)
Fosfato 10 mmol/L	TTAB 0,35 mmol/L	9,0	-20	As^{5+}, DMA, As^{3+}	4	(AKTER et al., 2005)
Borato (30 mmol/L)	**********	9,3	+30	AsC, AsB, As^{3+}, DMA, pAs, MMA, As^{5+}	25	(FORTE et al., 2005)
Fosfato (20 mmol/L)	**********	5,7	+15/30	As^{3+}, DMA, 3-AHPAA, 4-HPAA, o-ASA, MMA, 3-NHPAA, As^{5+}	15/20	(ROSAL et al., 2005)
Tris + SDS[5] 15 mmo/L cada	**********	9,0	+22	AsB, As^{3+}, AsC, DMA, MMA, As^{5+}	12	(YEH; JIANG, 2005)
Aniônicos primeiro e cationicos depois	**********	3,2–12,1	-16	As^{5+}, MMA, As^{3+}, DMA TMA+, AsC, TMAO, AsB	6 (cada corrida)	(KITAGAWA et al., 2006)
Fosfato (15 mmol/L)	**********	10,6	+25	As^{3+}; DMA; PAA; MMA; roxarsone; As^{5+}	25	(JAAFAR et al., 2007)
Borato (25 mmol/L) + Metanol (10% v/v)	**********	9,2	+30	AsB, As^{3+}, DMA, As^{5+}	7	(MEERMANN et al., 2008)
PDC[6] (10 mmol/L)	**********	10,3	-25	As^{5+}, MMA, DMA, As^{3+}	10	(JAAFAR et al., 2009)
Na_2MoO_4 + $NaClO_4$ 10 mmol/L cada	**********	3.0	-16	As^{5+}, MMA, DMA	16	(KOSHCHEEVA et al., 2009)
NaH_2PO_4 + $Na_2B_4O_7$ (20 + 5) mmol/L	**********	6,5	±30	As^{5+}, MMA, DMA, As^{3+}; e As^{3+}, DMA, MMA, As^{5+}	10	(YANG et al., 2009)
NaH_2PO_4 + $Na_2B_4O_7$ (20 + 5) mmol/L	**********	6,25	+20	As^{3+}, DMA, p-As, MMA, As^{5+},	< 12	(YANG et al., 2009)

Continuação da Tabela 3.2

[4] *n*-hexadecyltrimethylammonium bromide
[5] Sodium dodecyl sulfate
[6] 2,6-Pyridinedicarboxylic acid

3.3.1 Sistema de eletroforese capilar

Um sistema de eletroforese capilar, mostrado na Figura 3.1, foi projetado econstruído no laboratório empregando uma fonte de alta tensão, capilares de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e fios de platina de 0,3 mm de espessura. O sistema de injeção de amostras desenvolvido nesta pesquisa apresenta algumas modificações com respeito ao descrito anteriormente (LAVORANTE et al., 2004). As modificações realizadas visaram conferir maior robustez, facilidade de manejo e redução dos volumes de soluções. Em primeiro lugar foi construída uma estrutura em acrílico constituída por uma base plana, perpendiculares ao plano desta base foram inseridas duas hastes quadradas que serviram de guia a estrutura que suporta os componentes do sistema de eletroforese capilar. Esta estrutura consiste numa vareta retangular com dois orifícios quadrados, para inserção das hastes já mencionadas e que, permite ajustar a posição vertical da vareta sem incorrer em variações de altura entre ambos extremos da mesma. Esta vareta possui ademais ao longo de seu cumprimento, uma caneleta a modo de guia corrediça para encaixe do sistema injetor, à direita da figura, e o sistema coletor, à esquerda. Este sistema de encaixe permite o ajuste da distância entre ambos os recipientes, isto possibilita o emprego de capilares com diferentes cumprimentos, alem de permitir a fácil substituição de quaisquer dos componentes, por exemplo, quando se realiza o acoplamento da eletroforese capilar com sistemas de detecção pós-coluna, o dispositivo do recipiente coletor se substitui pela estrutura para fixação das respectivas interfaces.

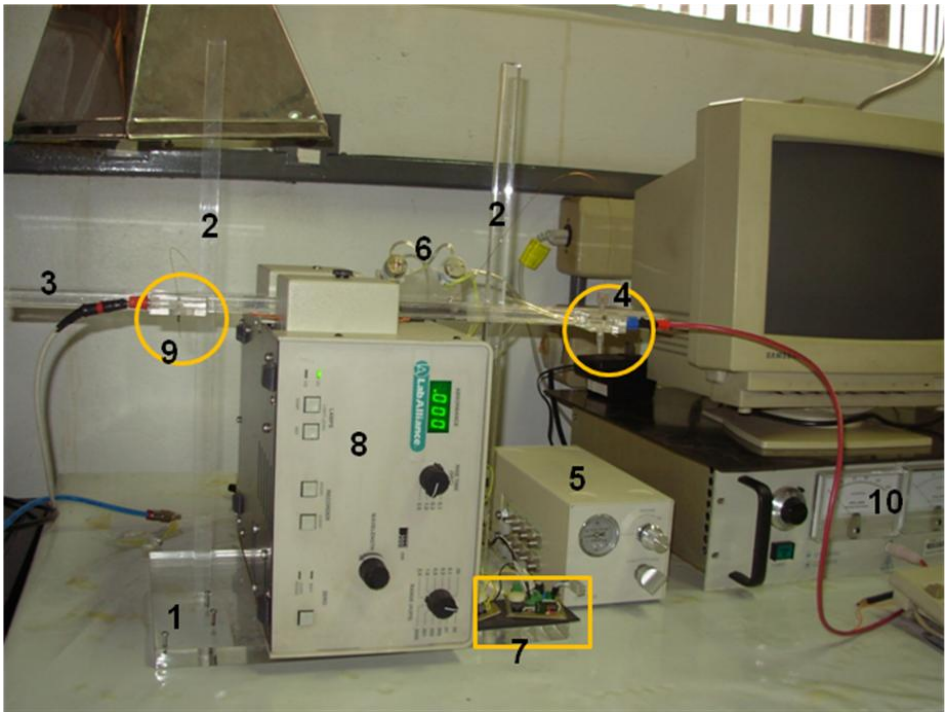


Figura 3.1 – Sistema de eletroforese capilar. Foto do sistema de eletroforese capilar projetado no Laboratório de Química Analitica do CENA. 1. Base, 2. Hastes, 3. Vareta, 4. Injetor, 5. Unidade controladora de gás, 6. Válvulas solenóide, 7. Circuito eletrônico, 8. Detector UV/Visível, 9. Recipiente coletor, 10. Fonte de alta voltagem.

O sistema de injeção hidrodinâmico foi também modificado para conseguir uma melhor precisão nas injeções realizadas, em primeiro lugar se construiu um injetor empregando-se um tubo recipiente de menor volume, tubo Eppendorf® de 200 µL. Para a injeção hidrodinâmica foi construído um sistema temporizador com duas válvulas solenóide, conectadas em serie entre uma unidade controladora de gás e o dispositivo injetor. Os tempos de abertura das válvulas foram controlados por um circuito eletrônico esquematizado na Figura 3.2, onde o botão S permite a abertura das válvulas solenóide sem controle de tempo e o botão PBS permite um controle temporizado de abertura das mesmas.

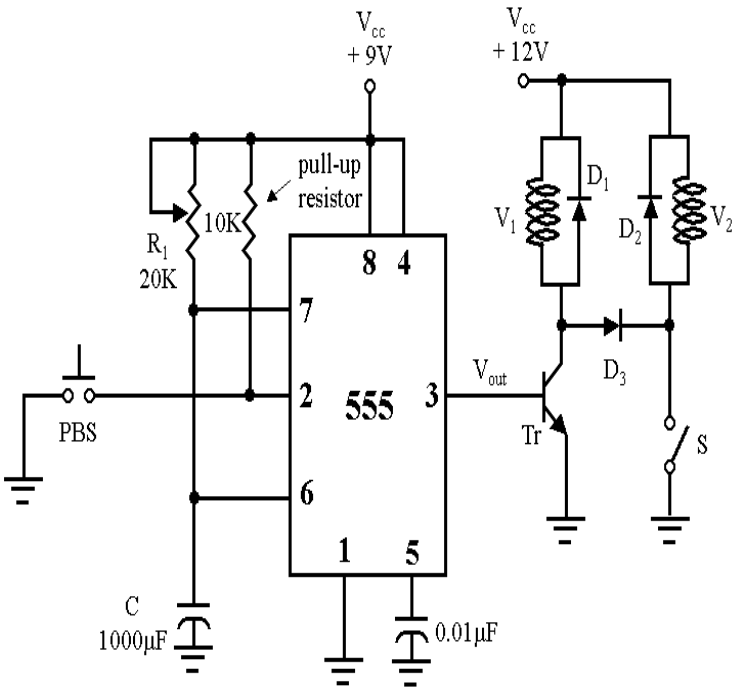


Figura 3.2 – Circuito eletrônico temporizador. Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para controle automático do tempo de injeção de amostras no injetor hidrodinâmico. V1 e V2 = válvulas solenóides de três vias; PBS = botão de pulso (trigger); Tr = transistor BC547; D1, D2 e D3 = diodos 1N4007; S = Botao de liga e desliga. O circuito eletrônico contendo um circuito integrado temporizador, 555 IC, atua como controlador dos tempos de acionamento de V1 e V2. (Desenvolvido por Sivanildo S. Borges (PQ).

O controle do tempo de injeção depende do circuito integrado IC555 e, do valor ajustado no resistor variável de 20 kΩ, segundo especificações do fabricante. Os tempos controlados por este circuito integrado se regem pela fórmula a seguir,

$$T = R\,(\Omega) / 1{,}1\,C\,(F)$$

onde T é o tempo em que a válvula ficará aberta, R o valor ajustado no resistor variável, para atingir o tempo de abertura desejado, e C a capacitância em faraday do capacitor ligado ao resistor variável (1000 μF).

As válvulas solenóides utilizadas para a construção do injetor hidrodinâmico suportam pressões de até 200 kPa e foram dispostas em seqüência, a modo de barreira dupla com a finalidade de evitar vazamentos do gás para o recipiente do eletrólito durante a separação eletroforética.

3.3.2 Efeito da variação do pH e da ddp aplicada em eletroforese capilar

Para estudar a influência da variação do pH na solução eletrolítica foram preparadas soluções de fosfato monobásico e dibásico de sódio em diferentes proporções, posteriormente foi medido o pH das soluções resultantes de cada uma das misturas. Estas soluções foram empregadas como tampão eletroforético e, foi observada a corrente elétrica resultante para cada solução empregada quando aplicada uma diferença de potencial. A corrente elétrica gerada durante uma separação eletroforética tem incidência direta na eficiência de separação, correntes elétricas muito elevadas provocam aquecimento da solução eletrolítica, induzindo gradientes de temperatura no interior do capilar (MORIN et al., 1992). Na Figura 3.3 se apresenta a variação da corrente elétrica observada quando aplicadas voltagens de 10 kV e 20 kV em soluções eletrolíticas com diferente pH.

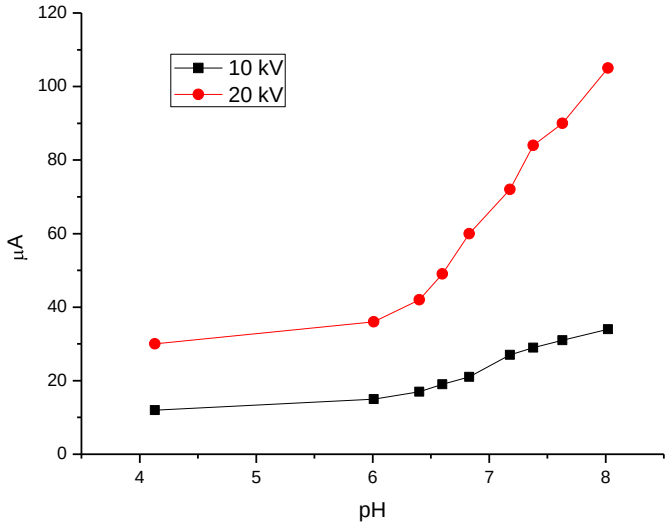


Figura 3.3 – Influência do pH e da ddp aplicada. Variação da corrente elétrica observada com relação aos diferentes pH da solução eletrolítica e à voltagem aplicada.

Como podemos observar, o aumento da corrente elétrica medida não mantém uma linearidade ao longo do experimento. Esta falta de linearidade se observa principalmente quando se atingem correntes elétricas mais elevadas e, está relacionada ao aumento da temperatura no interior do capilar eletroforético, o qual provoca variações nas propriedades físico-químicas da solução eletrolítica.

Visando um posterior acoplamento da eletroforese capilar com o espectrômetro de massas com fonte de plasma, todos os procedimentos descritos nestes dois itens se realizaram empregando HNO_3 em concentração 0,5 mol/L no recipiente coletor, com o intuito de evadir as interferências provocadas pelo íon $^{40}Ar^{35}Cl$ no canal de leitura *m/z* 75 quando empregamos HCl como solução auxiliar.

3.3.4 Acoplamento do sistema de eletroforese capilar com ICP-MS

Os estudos realizados por Olesik e colaboradores sobre a influência do volume de solução introduzido no plasma em espectrômetros de emissão ótica ou de massas com fonte de plasma ICP OES e ICP-MS, empregando vazões de soluções de amostras da ordem de μl/min, comprovando a eficiência da nebulização tanto na formação do aerossol como no transporte e nos mecanismos de atomização, mesmo quando empregados volumes da ordem de nl, tiveram vital relevância no desenvolvimento de acoplamentos de eletroforese capilar com espectrometros atômicos com fonte de plasma ICP (OLESIK; FISTER, 1991; OLESIK; HOBBS, 1994). Tais estudos levaram a estes autores a publicar em 1995 um trabalho pioneiro no campo da especiação, acoplando eletroforese capilar com um espectrômetro de massas com fonte de plasma CE-ICP-MS, para estudar a separação de espécies de Cr, As, Sr e Sn (OLESIK et al., 1995). A interface empregada para o acoplamento consistia em um nebulizador concentrico em cujo canal interno se inseriu, até a ponta, o capilar eletroforético. O segmento final do capilar eletroforético inserido no canal interno do nebulizador, aproximadamente 4 a 5 cm, foi recoberto externamente com tinta de prata. Esto possibilitou a conexão elétrica para garantir o aterramento, e foi possivel com esta configuração introduzir um pequeno volume de amostra no espectrômetro conseguindose um volume morto muito pequeno. Um ano mais tarde, Kinzer e colaboradores apresentam a primeira interface que permite a introdução en forma continua de uma solução eletrolítica auxiliar (KINZER et al., 1996). Nesta mesma linha de pesquisa, ao estudar a eficiência do acoplamento com o nebulizador DIN (Direct Injection Nebulizer), Liu e colaboradores propõem a utilização de uma peça em forma de “T” na interface CE-ICP (LIU et al., 1995). A partir de então surgem diversas pesquisas abordando

estudos sobre a eficiência de diferentes nebulizadores empregados na interface CE-ICP para estudos de especiação (LU et al., 1994; 1995; LU; BARNES, 1996; MEI et al., 1997; KIRLEW et al., 1998; MAJIDI; MILLER-IHLI, 1998a; 1998b; ACKLEY et al., 2000; DAY et al., 2000). A separação e detecção de seis espécies de arsênio empregando eletroforese capilar acoplada à espetrometro de massas com fonte de plasma CE-ICP-MS foi reportado por (MICHALKE; SCHRAMEL, 1998), conseguindo limites de detecção de 15 μg/l para As(III), MMA, DMA e As(V), e 65 μg/l para arsenobetaina e arsenocolina. Um ano mais tarde, empregando também o acoplamento CE-ICP-MS, (VAN HOLDERBEKE et al., 1999) conseguem a separação das mesmas seis espécies atingindo-se limites de detecção de 1-2 μg/l.

Para o acoplamento do sistema de eletroforese capilar “caseiro” montado no nosso laboratório com o espectrômetro de massas com fonte de plasma, foi necessária a realização de ajuste de novos parâmetros. A interface para o acoplamento foi construída empregando uma peça de PEEK em formato “T” que permite a passagem de lado a lado do capilar eletroforético, além da introdução de um fluxo perpendicular de uma solução eletrolítica auxiliar que possibilita fechar a corrente elétrica no interior do capilar, assim como o transporte dos analitos emergentes no extremo terminal para o nebulizador do espectrômetro de massas. Como observado na Figura 3.5, pelo lado esquerdo da peça em T se fixa o capilar de modo a evitar não só o desplazamento do mesmo como também possíveis vazamentos das soluções que fluem no interior do sistema. Através da entrada perpendicular ao capilar eletroforético, além do tubo correspondente para a introdução da solução eletrolítica auxiliar, foi inserido um fio de platina de diâmetro igual a 0,3 mm que ficou em contato com esta solução e permitiu o aterramento para conferir estabilidade elétrica ao sistema. No extremo emergente desta peça em T foi

fixado também um pequeno tubo de diâmetro interno levemente superior ao diâmetro externo do capilar, com isto se pretendeu possibilitar a passagem de uma delgada camada de líquido (solução eletrolítica auxiliar), suficiente como para permitir o contato elétrico sem provocar diluições muito elevadas dos analitos emergindo do capilar. Este tubo foi inserido no canal de introdução de amostras do nebulizador do espectrômetro de massas.

Outro parâmetro extremamente importante a ser considerado neste tipo de acoplamentos resulta ser a posição do capilar no interior do nebulizador. Observando a Figura 3.4 poderemos entender alguns aspectos da eficiência de separação assim como da sensibilidade de detecção, relacionados à posição do capilar no canal do nebulizador. Os nebulizadores concéntricos, como o esquematizado nesta figura, apresentam um afunilamento de seu canal de introdução de amostras, este canal se inicia com alguns poucos milímetros de diâmetro (no extremo de amostragem, à esquerda) para possibilitar a inserção de tubos de amostragem, o mesmo se afunila na parte média do nebulizador, até atingir frações de milímetro, inclusive uns poucos micrômetros, dependendo da vazão de nebulização nominal de cada tipo, mantendo este diâmetro até o final para possibilitar o efeito Venturi no extremo de nebulização. Deste modo, o extremo terminal do capilar eletroforético não deve ficar muito longe do afunilamento, como se mostra na Figura 3.4a uma vez que o volume da solução auxiliar arredor do capilar será diametralmente superior ao volume interno do mesmo, isto somado aos escassos nanolitros de amostra injetados no capilar, provocariam uma diluição muito elevada dos analitos, comprometendo a sensibilidade na detecção. Entretanto, se considerarmos que, devido ao bombeamento da solução auxiliar se terá a partir deste ponto um fluxo do tipo pressurizado, se a distância entre o extremo terminal do

capilar e o ponto de nebulização for muito grande, ocorrerá junção ou mistura das espécies com menor separação entre si. Por outro lado, quando posicionamos o capilar tão perto do afunilamento quanto possível, como observado na Figura 3.4b, se deve considerar que a vazão da solução auxiliar tem que suprir a vazão de aspiração do nebulizador, evitando-se assim a aspiração da solução pelo interior do capilar. Esta vazão, por outro lado, não pode ser maior do que a de aspiração do nebulizador, de forma a garantir nebulização eficiente. O retorno da solução no sentido do capilar depende da vazão da solução auxiliar e do posicionamento do capilar no canal interno do nebulizador. A pressão para o capilar impede a separação como assim também a saída dos analitos do capilar eletroforético.

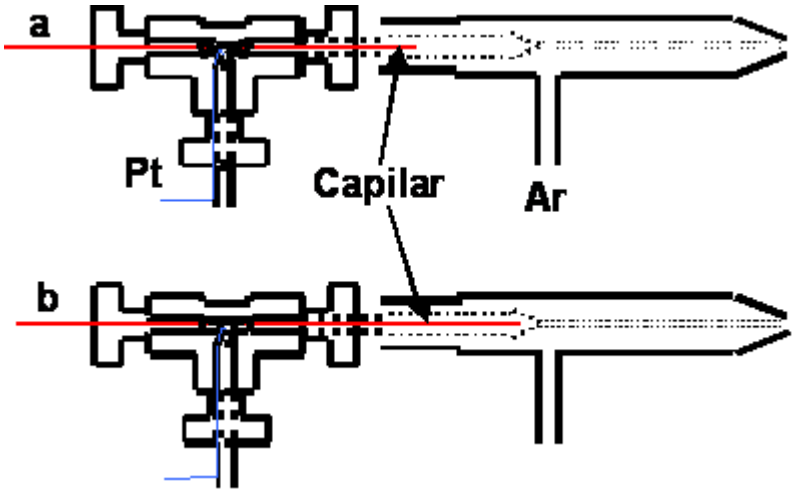


Figura 3.4 – Interface CE-ICP. Interface para o acoplamento da eletroforese capilar com espectrômetros de massas o de emissão ótica com fonte de plasma (CE-ICP). a y b mostram duas posições distintas do extremo do capilar no interior do canal de amostragem do nebulizador.

O procedimento para verificar que estes fenômenos mencionados não estão ocorrendo consiste no controle da variação de corrente e a formação de gotas na

ponta de injeção da amostra no capilar. Se ao aplicarmos a voltagem estabelecida para a separação eletroforética observarmos instabilidade ou falta de corrente elétrica significará, ou que pode estar ocorrendo aspiração hidrodinâmica da solução no interior do capilar, ou a presença de bolhas de ar. Neste trabalho foi utilizado um nebulizador microconcéntrico de alta eficiência (HEN) com vazão nominal de 100 μL/min.

Os parâmetros para a separação das espécies de arsênio no sistema CE-ICP-MS se apresentam na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Condições operacionais do acoplamento CE-ICP-MS para a obtenção dos eletroferogramas apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7 respectivamente.

Parâmetros empregados no sistema CE-ICP-MS	
Capilar 75 mm d.i.	60 cm
Tampão	Fosfato 20 mmol/L; TTAB 1,5 mmol/L; pH 9
Eletrólito auxiliar	HNO_3 0,5 mol/L
Temperatura	Temp. do laboratório 20°C
Injeção das amostras	5 s; 25 kpa
Voltagem aplicada	-15 kV
Corrente observada	~35 μA
Potência do plasma	1,3 kW
Gás auxiliar	0,5 L/min
Gás de refrigeração	12 L/min
Nebulização(*)	100 μL/min

(*) ver texto abaixo

O bombeamento da solução eletrolítica auxiliar na interfase CE-ICP foi realizado através de uma bomba de seringa e, a vazão de bomeamento foi de 100 μL/min, vazão nominal do nebulizador empregado. Segundo recomendações do

fabricante, para atingir a vazão nominal do nebulizador microconcêntrico de alta eficiência deve ser empregada uma pressão do gás de nebulização de aproximadamente 100 lbf/pol^2, para conseguir esta pressão se utilizou uma fonte externa de gás argônio, um cilindro de 3 m^3, de qualidade analítica, equipado com um manômetro capaz de medir esta pressão com a precisão requerida. A melhor relação sinal/ruído foi conseguida quando empregamos 114 lbf/pol2, assim sendo, todas as separações eletroforéticas empregando o sistema CE-ICP-MS foram realizadas empregando esta pressão do gás de nebulização.

3.3.5 Acoplamento da eletroforese capilar com o ICP-MS e geração de hidretos na interface

A geração de hidretos têm sido uma das técnicas mais utilizada para a introdução de espécies gasosas no ICP a partir de amostras líquidas. Espécies voláteis de As, Se, Sb, Bi e outros elementos sao formados por redução química com borohidreto de sódio ou potássio em meio ácido com excelente eficiência (HOWARD, 1997). Esta técnica tem sido talvez o principal método de derivatização de amostras na determinação de espécies inorgânicas de arsênio (HOLAK, 1969).

Desenvolvida inicialmente como método para absorção atômica (AAS), onde o borohidreto (III) de sódio ou potássio ($NaBH_4$ ou KBH_4) dissolvido em solucoes diluidas de hidrôxido de sódio é utilizado como reagente redutor para produzir arsina em méio ácido (Hung, Nekrassova *et al.*, 2004).

O acoplamento da geração de hidretos em linha com detectores atômicos AAS (espectrometria de absorção atômica), AFS (espectrometria por fluorescência atômica) ICP OES (emissão atômica com plasma) e ICP-MS (espectrometria de massas com plasma), incrementa a sensibilidade da análise, e reduz possíveis

efeitos de matriz, (KARTHIKEYAN; HIRATA, 2003). A principal vantagem desta técnica acoplada ao ICP é que não há necessidade do emprego de nebulizadores, utilizando, a fase gasosa, separada da fase líquidda num dispositivo de separação de fases é transportada com maior eficiência para o plasma.

O primeiro acoplamento da eletroforese capilar com detecção por espectrometria de massas com fonte de plasma e derivatização para a geração de hidretos voláteis na interface CE-HG-ICP-MS, foi descrito em 1997 por Magnuson e colaboradores, estes autores reportam a separação de espécies de arsênio em um tempo inferior a 15 minutos e, em um segundo trabalho reportam a separação de espécies de arsênio e selênio em 16 min (MAGNUSON et al., 1997a; 1997b). Nesses trabalhos a separação de fases foi realizada empregando uma membrana tubular de PTFE expandido de alta densidade, entretanto os hidretos são transferidos devido a pressão gerada pela reação no interior do sistema. Para evitar pressão sobre o capilar eletroforético foi utilizando uma mini bomba isolando o sistema eletroforético do sistema HG-ICP. Mais tarde, Richardson e colaboradores reportam um sistema de tubos concêntricos para a introdução da solução auxiliar e dos reagentes HCl e $NaBH_4$ para a reação de geração dos hidretos. A pressão gerada no interior do sistema contornou-se mediante o controle da vazão e concentração do ácido e do redutor e, a separação de fases se realizou em uma câmara ciclônica refrigerada (RICHARDSON et al., 2004). Suárez e Giné (2005), reportam a separação de espécies inorgânicas de arsênio utilizando como câmara de separação de fases o corpo de uma seringa de plástico de 10 mL, em cuja base foram inseridos dois tubos, para entrada do borohidreto de sódio e extração do resíduo líquido gerado; o ácido, que serviu também como solução eletrolítica auxiliar foi introduzido mediante uma peça em formato T num tubo concêntrico com o

extremo terminal do capilar eletroforético. A solução ácida contendo as espécies separadas goteja livremente desde uma altura fixa e a reação ocorre ao entrarem as gotas em contato com a solução redutora no interior da câmara de separação.

Uma vez que a sensibilidade da detecção por CE-UV é muito baixa para as necessidades analíticas deste trabalho e, recordando que o arsênio é um elemento químico encontrado em níveis de traços em amostras biológicas e ambientais, após a avaliação dos parâmetros para as separações eletroforéticas, se procedeu ao acoplamento deste novo sistema de eletroforese capilar com o espectrômetro de massas com fonte de plasma, mediante derivatização para a geração dos hidretos voláteis de arsênio na interface. Esta interface foi construída baseada na interface apresentada anteriormente (SUÁREZ; GINÉ, 2005), esquematizada na Figura 3.5. Neste sistema não ocorre pressão contra o capilar porque este encontra-se recuado dentro de um tubo e a conexão direta da câmara com a tocha facilita o transporte dos gases, o que aumenta a eficiência de condução dos hidretos para perto de 10%. A renovação das soluções na base da câmara foi ajustada de forma a evitar efeitos de memória entre as espécies.

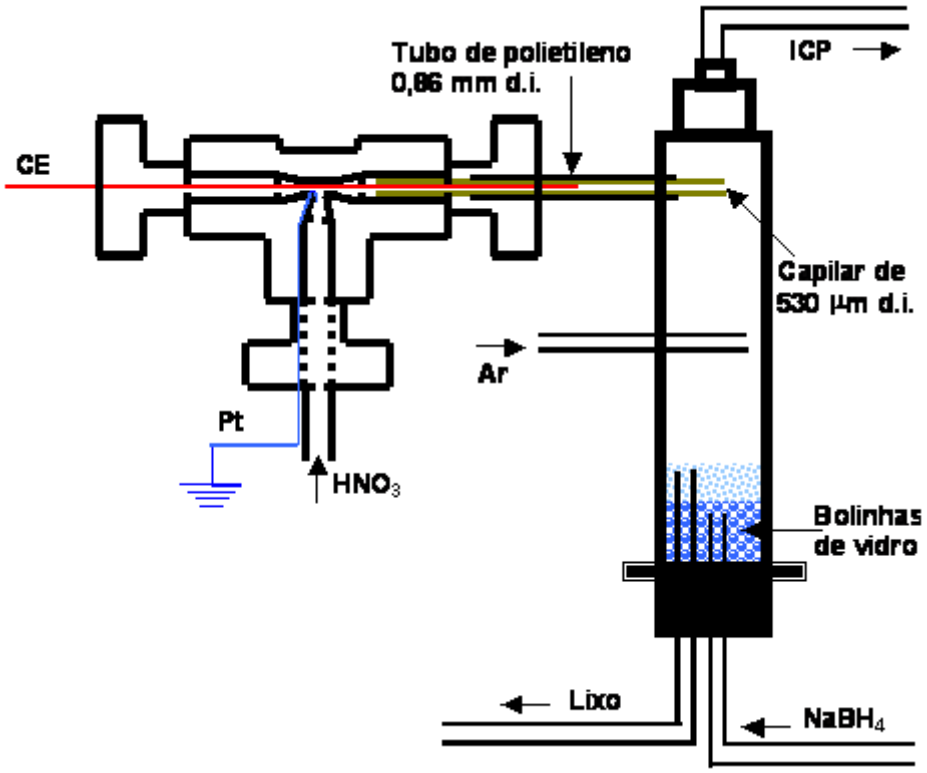


Figura 3.5 – Câmara de separação de fases. Interface para o acoplamento de sistemas de eletroforese capilar ou cromatografia líquida projetado e confeccionado no laboratório de Química Analítica do CENA/USP

Neste acoplamento, o gás de nebulização foi empregado para o transporte dos analitos gasosos gerados na reação de geração de hidretos, um tubo que em condições normais de operação se conecta ao nebulizador, foi adaptado na lateral da seringa utilizada como câmara de separação, como se mostra na Figura 3.5. A otimização da vazão deste gás esta relacionada com a limpeza da câmara de separação para evitar que os analitos separados no capilar eletroforético se juntem nesta câmara comprometendo desta maneira a eficiência da análise.

Os parâmetros otimizados para o emprego desta interface no acoplamento CE-HG-ICP-MS são detalhados na Tabela 3.4 a seguir.

Tabela 3.4 – Parâmetros empregados para o acoplamento CE-HG-ICP-MS para separação das espécies de arsênio em amostras de urina e camarão.

Parâmetros empregados no sistema CE-HG-ICP-MS	
Capilar 75 mm d.i.	40 cm
Tampão	Fosfato 10 mmol/L; TTAB 0,35 mmol/L; pH 10
Eletrólito auxiliar	HNO_3 0,5 mol/L (1 mL/min)
Borohidreto de sódio	1 % em 0,1% NaOH (0,5 mL/min)
Temperatura	Temp. do laboratório 20°C
Injeção das amostras	5 s; 25 kpa
Voltagem aplicada	-15 kV
Corrente observada	~60 μA
Potência do plasma	1,3 kW
Gás auxiliar	0,5 L/min
Gás de refrigeração	12 L/min
Nebulização(*)	0,6 L/min

(*) limpeza da câmara de separação de fases.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Determinação de espécies de arsênio pelo sistema acoplado CE-ICP-MS

Após a otimização dos parâmetros incumbidos na interface CE-ICP se realizaram determinações em amostras de camarão. Na Figura 3.6 se apresenta um eletroferograma de um extrato de camarão seco, como podemos observar ocorreu o aparecimento de um único pico correspondente à arsenobetaina AsB.

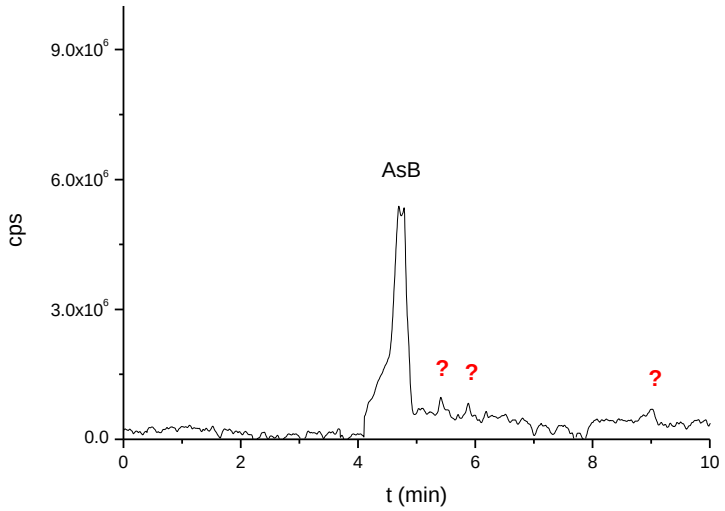


Figura 3.6 – Eletroferograma de um extrato de camarão seco, extraído em banho de ultra-som empregando-se água como solvente. Se observa o pico correspondente à arsenobetaina além de outros três picos não identificados (?).

No mesmo eletroferograma se observam outras três possíveis espécies não identificadas, marcadas pelos signos de interrogação.

Na seqüência se procedeu a adicionar na solução da amostra concentrações conhecidas de arsenito, arsenato, monometil e dimetilarsênio ao extrato, observa-se na Figura 3.7 a separação das 5 espécies de arsênio num tempo de 11 minutos, a intensidade do sinal para arsenobetaina foi diminuído devido à diluição sofrida na mistura das soluções.

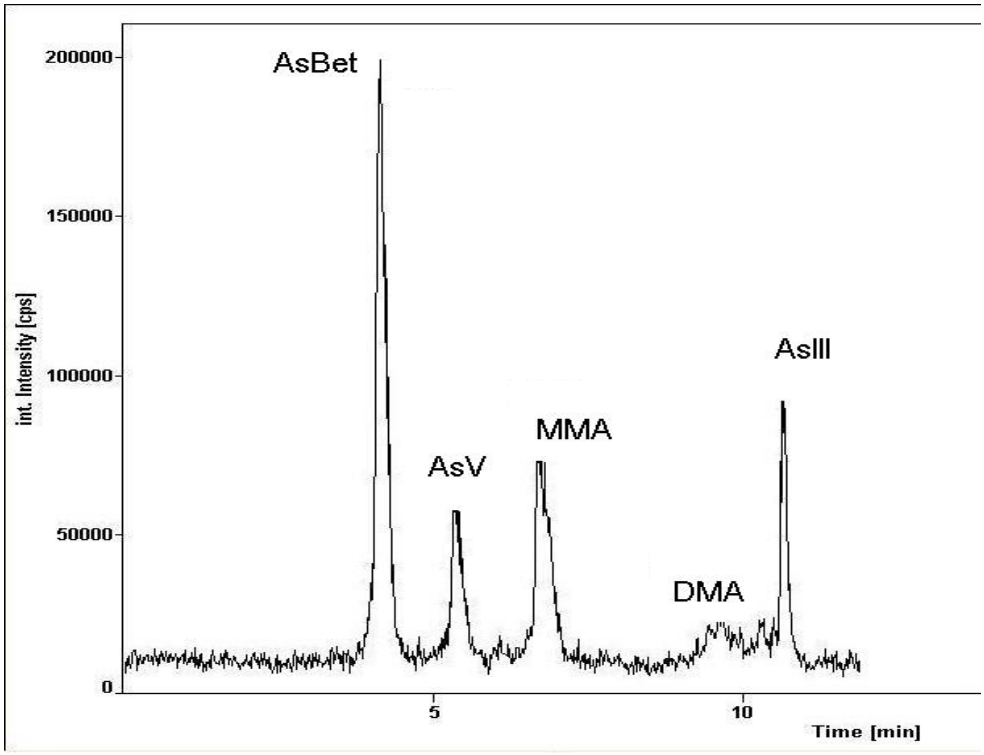


Figura 3.7 - Separação de espécies de arsênio em amostra de camarão extraída por ultra-som com água como solvente. Adição de As^{5+}, MMA, DMA e As^{3+}, em concentração 100 μg/L cada expressados como molécula. (As^{5+}: 52,6 %As; MMA: 53,5% As; DMA: 54,3% As; As^{3+}: 59,5% As).

Como observado nesta figura, a recuperação de DMA foi inferior à recuperação das outras espécies, possivelmente devido a efeitos de matriz. Outros autores têm relatado discrepâncias na extração aquosa assistida por ultra-som de DMA em amostras biológicas (WAHLEN et al., 2004). Entretanto, a utilização do nebulizador de alta eficiência combinado com o ICP-SFMS conferiu a este acoplamento proposto apresentou maior sensibilidade que outros sistemas propostos anteriormente (CASIOT et al., 2002) e comparável com os resultados apresentados por Yang e colaboradores (YANG et al., 2009).

3.4.2 Determinação de espécies de arsênio pelo sistema acoplado CE-HG-ICP-MS

Com a finalidade de conseguir maior sensibilidade na detecção das espécies de arsênio separadas por eletroforese capilar se empregou o sistema CE-HG-ICP-MS descrito no item 3.3.5. O eletroferograma apresentado na Figura 3.8 corresponde à separação de quatro espécies de arsênio em soluções padrão em concentração 50 μg/L, como arsênio de: As^{5+}, MMA, DMA, e As^{3+}.

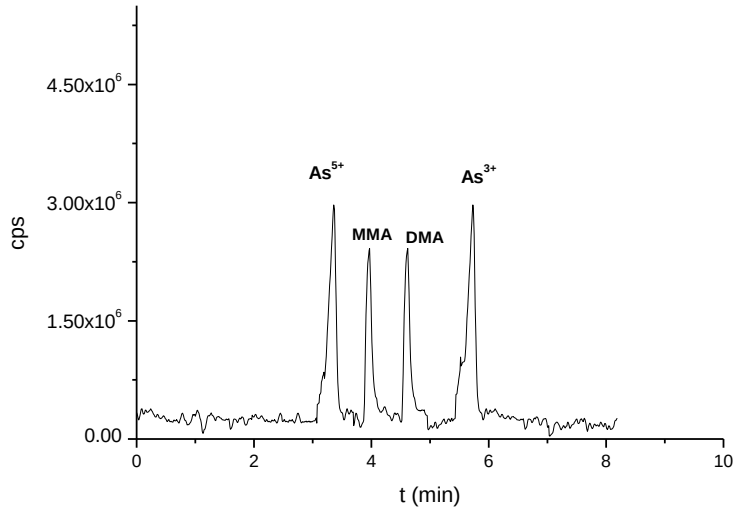


Figura 3.8 – Eletroferograma de quatro espécies de arsênio separadas por eletroforese capilar com geração de hidretos na interface e detecção por espectrometria de massas com fonte de plasma. CE-HG-ICP-MS.

Este acoplamento CE-HG-ICP-MS foi empregado também para determinar espécies de arsênio em amostras de urina contaminadas com quatro espécies de arsênio, arsenito, arsenato, mono e dimetilarsênio. Um eletroferograma correspondente a estas amostras se apresenta na Figura 3.9. Podemos observar

que os eletroferogramas das amostras diferem levemente dos eletroferogramas obtidos com as soluções testemunha, isto demonstra a incidência muito forte dos efeitos de matriz.

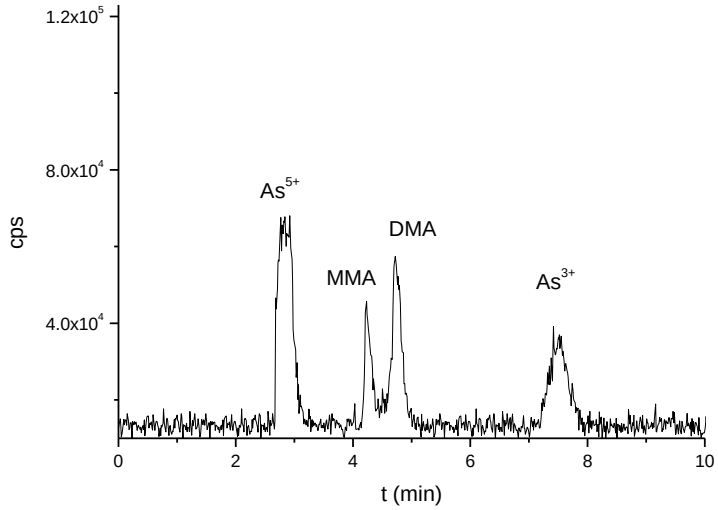


Figura 3.9 – Eletroferograma de espécies de arsênio em uma amostra de urina contaminada, empregando eletroforese capilar com geração de hidretos na interface com detecção por ICP-SFMS.

O emprego de um eletrólito diferente e um capilar de cumprimento menor que o empregado no acoplamento CE-ICP, permitiu melhorar o tempo total da análise, contornando um possível maior tempo resultante da derivatização para geração de hidretos na interface. Os resultados obtidos, tanto para as soluções padrão como par as amostras de urina contaminada, apresentaram maior sensibilidade e resolução dos picos que resultados descritos anteriormente para amostras de água de torneira e de rio adicionadas com as mesmas espécies estudadas neste trabalho (MAGNUSON et al., 1997a; RICHARDSON et al., 2004).

3.5 Conclusões

Os sistemas acoplados CE-ICP e CE-HG-ICP empregados neste trabalho são uma ferramenta acessível e robusta para análise de especiação. As análises empregando os sistemas descritos são realizadas em tempos relativamente curtos.

Estes sistemas devem ser otimizados para cada caso e, procedimentos analíticos como adição de padrão e testes de recuperação são altamente recomendados, uma vez que apresentam alta sensibilidade a efeitos de matriz.

4 Especiação de As por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Fluorescência Atômica

Resumo

Neste capítulo se apresentam os fundamentos para a separação e detecção das espécies de arsênio em amostras de camarão empregando cromatografia líquida de alta eficiência. Proporciona-se ademais a avaliação dos parâmetros para a otimização de um sistema acoplado LC-HG-AFS. O sistema LC-HG-AFS foi montado empregando uma coluna de troca aniônica Hamilton PRP-X-100, uma bomba isocrática de cromatografia líquida, uma válvula solenóide de três vias para a troca dos eluentes, uma bomba peristáltica para bombeamento dos reagentes inseridos pós-coluna e o espectrômetro de fluorescência atômica com sua respectiva câmara de geração de hidretos.

Visando a redução do volume de resíduos líquidos nocivos para o meio ambiente, gerados durante as pesquisas, foi implementado de um fluxo adicional de hidrogênio para a manutenção da chama do espectrômetro de fluorescência. Para tal fim foi utilizado um rotâmetro adicional com escala adequada para a mensuração das vazões de hidrogênio empregadas.

Abstract

Fundamentals for arsenic speciation in shrimp samples by liquid chromatography are presented in this chapter. The evaluation of parameters for the optimization of coupling system LC-HG-AFS are also offered. This system was ensemble by using an anion exchange column (Hamilton PRP-X-100), an isocratic chromatography pump, a three way solenoid valve and the atomic fluorescence spectrometer.

In order to avoid unnecessary large amounts of waste solutions generated during this research, an additional hydrogen flow was introduced into the HG-AFS system for flame upholding. For that an additional rotameter was adapted to the system.

4.1 Introdução

A cromatografia é um método físico-químico de separação, baseada na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária, imiscíveis entre si (DEGANI et al., 1998). Diversas forças físicas e químicas atuam entre os componentes da amostra e as duas fases, as quais determinam a separação e resolução das espécies, assim a separação pode ser considerada como resultado da distribuição destas espécies entre as duas fases (FALLON et al., 1987). A cromatografia líquida de alta eficiência CLAE ou HPLC (do inglês High Performance Liquid Chromatografy) tornou-se possível devido a tecnologias capazes de empacotar dentro de colunas altamente resistentes, partículas da ordem de 4 a 10 μm. Isto aumentou consideravelmente a superfície de contato entre a fase móvel e a fase estacionária, melhorando-se assim a eficiência de separação. Entretanto para possibilitar a passagem da fase móvel através do empacotamento na coluna, de baixa permeabilidade, se necessitaram bombas capazes de bombear a elevadas pressões uma vazão continua sem pulsação, daí que o primeiro nome dado a esta técnica fosse cromatografia líquida de alta pressão (DEGANI et al., 1998).

A cromatografia de intercâmbio iônico tem seu fundamento nas interações entre as cargas das moléculas presentes na amostra e as cargas imobilizadas na fase estacionária. Esta técnica se subdivide em intercambio aniônico e intercambio catiônico dependendo de que as cargas imobilizadas na fase estacionária sejam positivas ou negativas respectivamente.

Uma das colunas cromatográficas mais utilizadas em cromatografia líquida para separação de espécies de arsênio, em diversos tipos de amostras, é a coluna

de troca aniônica Hamilton PRP-X100. Esta coluna foi empregada em diversos trabalhos nos quais realizou-se o acoplamento em linha da cromatografia líquida com diferentes sistemas de detecção tais como: espectrometria de massas com fonte de plasma (IC-ICP-MS) para determinação de As(III), As(V), MMA e DMA em amostras biológicas (THOMAS; SNIATECKI, 1995), determinação de espécies de arsênio em algas comestíveis (VAN HULLE *et al.*, 2002); para determinação de espécies de arsênio acumuladas em lá de carneiros expostos a arsenuaçúcares (RAAB et al., 2002); com geração de hidretos em linha e detecção por espectrometria de absorção atômica (IC-HG-AAS) para especiação de As(III), MMA, DMA, arsenobetaina (AsB), arsenocolina (AsC), óxido de trimetilarsina (TMAO) e íon trimetilarsônio em amostras de urina humana (Tsalev, Sperling *et al.*, 1998); acoplada a espectrometria de emissão atômica ICP-AES (hoje denominada ICP OES) para separação de As(III), As(V) e DMA (SCHLEGEL et al., 1994), e com a derivatização pós-coluna para a geração dos hidretos (IC-HG-ICP-AES) para a determinação específica de As(III), As(V), MMA e DMA (GETTAR et al., 2000). Alguns autores têm acoplado esta coluna em sequência com colunas de troca catiônica, SuperCosil LC-SCX visando a separação de espécies aniônicas e catiônicas em moluscos (SOROS et al., 2003), Hamilton PRP-X200 para estudos de estabilidade de espécies de arsênio em raiz (PIZARRO et al., 2003), Alltech Adsorbosphere SCX 5U para determinação de espécies de arsênio em materiais de referência (SLEJKOVEC et al., 1999) e detecção por fluorescência atômica (AFS).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Reagentes, soluções e equipamentos

- ✓ Soluções estoque de fosfato monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) de sódio em concentração 1 mol/L cada uma. O tampão de trabalho foi semanalmente preparado por diluições adequadas das soluções estoque para alcançar a concentração e o pH desejados para o carregador e o eluente empregado na cromatografia líquida.
- ✓ Ácido fosfórico empregado para o ajuste do pH dos tampões de trabalho, (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Ácido clorídrico (HCl), em concentração 1,5 mol/L para acidificação em linha das soluções efluentes da coluna cromatográfica, (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Tetrahidroborato de sódio ($NaBH_4$) para a reação de geração dos hidretos voláteis necessários para a detecção por fluorescência atômica, (Nuclear, CAQ Casa da Química Ind. e.Com.Ltda., Diadema-SP, Brasil).
- ✓ Ácido nítrico destilado e metanol de qualidade cromatográfica, (Merck, Darmstadt, Alemanha), empregados para preparar a solução utilizada para a regeneração da coluna cromatográfica segundo instruções do fabricante.
- ✓ Coluna de troca aniônica Hamilton PRP-X100, com dimensões iguais a 250 mm de cumprimento e 4,1 mm de diâmetro, tamanho de partículas de 10 micrômetros, (Hamilton Company, Reno, Nevada-USA).
- ✓ Bomba isocrática para cromatografia líquida LC-10AD, (Shimadzu Corporation, Kyoto-Japão).

- ✓ Injetor manual para cromatografia líquida Rheodyne 7125 com alça de injeção de 100 µL marca, (Rheodyne, Systec, Innovadyne Products, Berkeley, California-USA).
- ✓ Válvula solenóide de três vias NR161T031, (NResearch and Development Incorporated).
- ✓ Rotâmetro para medição do fluxo adicional de hidrogênio com escala graduada de 10 a 160 mL/min, calibrada para medição de argônio a 25°C e 3 kPa de pressão, (AppliTech Indústria e Comércio de Equipamentos Industriais Ltda., Santana de Parnaíba – SP, Brasil).
- ✓ Bomba peristáltica de oito canais marca Ismatec, (Ismatec S.A., Glattbrugg, Suiza)
- ✓ Espectrômetro de fluorescência atômica modelo PSA Excalibur, (PS Analytical Ltd., Orpington, Kent, Reino Unido).
- ✓ Câmara de separação de fases para geração de hidretos, própria do espectrômetro de fluorescência atômica PSA Excalibur.

Todos os reagentes e soluções utilizadas para as análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de fluorescência foram de grau analítico. As respectivas diluições levaram-se a cabo empregando água purificada em sistema Milli-Q com uma resistividade de 18.2 MΩ .cm (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.2.2 Sistema LC-HG-AFS

Foi montado no laboratório um sistema acoplado LC-HG-AFS utilizando uma bomba isocrática para cromatografia líquida, coluna de troca aniônica Hamilton PRP-

X100, e um detector de fluorescência atômica PSA Excalibur para arsênio. Devido à falta de uma bomba de gradiente, se adaptou na entrada da bomba isocrática uma válvula solenóide de três vias, a qual permitiu intercambiar as soluções empregadas como eluente na separação cromatográfica através de um controle programável dos tempos de abertura e fecho da válvula. Um esquema detalhado do sistema montado se apresenta na Figura 4.1 a seguir.

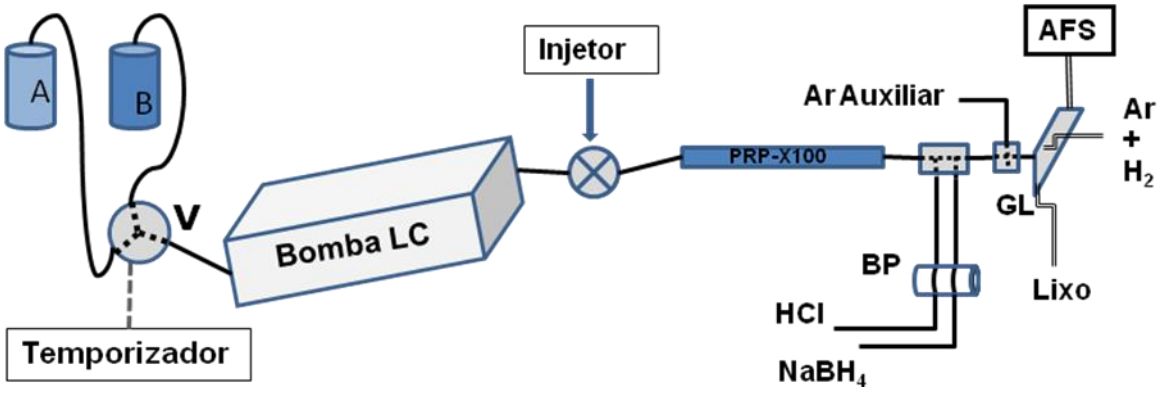


Figura 4.1 – Esquema do sistema LC-HG-AFS montado no laboratório, A e B são os tampões empregados; V= Válvula solenóide, BP= Bomba Peristáltica, GL= Câmara de separação Gás/Líquido e AFS o detector de fluorescência atômica.

4.2.3 Volatilização das espécies de arsênio

A volatilização dos elementos químicos para fins analíticos foi amplamente utilizada ao longo dos anos pelos químicos, o conhecido teste de Marsh foi pioneiramente descrito em 1836 para a identificação de arsênio, mais tarde em 1861 Bloxam descreve um método eletrolítico para formação de arsina (AsH_3) e estibina (SbH_3). Devido às vantagens desta técnica, que permite separar o analito de sua matriz, o emprego da mesma foi explorado para todos os elementos capazes de formar hidretos voláteis. Desde um ponto de vista analítico a geração de hidretos

voláteis considera-se como uma reação de redução do metal ou metalóide a ser analisado, onde o redutor químico, geralmente zinco metálico ou borohidreto de sódio (LABORDA et al., 2002).

Várias publicações cientificas hão sido reportadas ao longo dos anos abordando diversas hipóteses sobre os mecanismos implicados nas reações de formação dos respectivos hidretos. Neste sentido, Pergantis e colaboradores apresentaram um estudo dos mecanismos de reação na geração de hidretos de arsênio, empregando reagentes marcados com deutério e análise por espectrometria de massas (PERGANTIS et al., 1997). No mesmo ano, Howard apresentou uma visão do emprego da geração de hidretos em análise de elementos traços (HOWARD, 1997).

Além do arsênio, outros elementos químicos como antimônio, bismuto, germânio, chumbo, selênio, telúrio, estanho e vanádio são elementos formadores de hidretos voláteis (LABORDA et al., 2002). A geração de hidretos de cádmio e zinco também foi descrita para detecção por espectrômetros de fluorescência atômica (SUN et al., 2002; LI et al., 2004). Mais recentemente D'Ulivo e colaboradores publicam um estudo sobre os mecanismos de reação implicados na formação de hidretos voláteis de bismuto, antimônio, arsênio, germânio, estanho e selênio empregando compostos deuterados e espectrometria de massas (D'ULIVO et al., 2005). Esse mesmo ano foi publicada uma revisão criteriosa e completa sobre os mecanismos de geração de hidretos e a atomização em espectrometria de absorção atômica (AAS) (KUMAR; RIYAZUDDIN, 2005).

Devido aos excelentes limites de detecção atingidos quando se aplica a técnica de geração de hidretos voláteis, especialmente quando acoplada a métodos de atomização como, por exemplo, tubos de quartzo aquecido, espectrômetros de

absorção atômica, de fluorescência atômica ou de emissão ótica com fonte de plasma, esta técnica é amplamente empregada para determinação de elementos em uma extensa diversidade de matrizes tais como amostras ambientais, biológicas ou alheações metálicas (CAMPBELL, 1992; LABORDA et al., 2002).

A técnica mais comumente utilizada para a volatilização das espécies de arsênio é a reação com borohidreto de sódio ($NaBH_4$) em meio ácido, geralmente ácido clorídrico (HCl). O primeiro trabalho encontrado nos sítios de busca cientifica data de 1960, onde a detecção de hidretos de arsênio, selênio, antimônio, bismuto, telúrio, chumbo e estanho em amostras de carvão mineral foram reportados empregando-se um tubo de quartzo aquecido (NADKARNI, 1982). Uma vantagem muito importante desta técnica é que não há necessidade de se utilizar nebulizadores, a fase gasosa é separada da fase líquida impedindo o arraste dos sólidos para dentro do plasma, o que provocaria um elevado efeito memória e baixa eficiência de ionização.

Embora a condição ácida para a reação de geração de hidretos seja mais comumente proporcionada pelo emprego de ácido clorídrico, as condições de reação assim como a eficiência da geração dos hidretos de arsenito As(III), arsenato As(V), ácidos monometil e dimetilarsênio (MMA e DMA), empregando-se diferentes ácidos orgânicos e inorgânicos foi estudado por Anderson e colaboradores (ANDERSON et al., 1986). Entretanto, na determinação de hidretos de arsênio por espectrômetros de massas com fonte de plasma (ICP-MS), a escolha de outro ácido como ácido tioglicólico ou nítrico é recomendável devido á interferência espectral ocorrida na massa 75 provocada pelo íon $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$ produzido no plasma.

Embora as espécies de arsênio mais comumente conhecidas como formadoras de hidretos sejam as espécies mais tóxicas arsenito, arsenato e os

ácidos mono e dimetil arsênio, a faixa de espécies de arsênio capazes de ser detectadas mediante formação de hidretos voláteis pode ser ampliada através da incorporação de processos de decomposição post-coluna, onde as espécies não reativas são convertidas em arsenato (AsV) antes da reação de volatilização (DAGNAC et al., 1999; GOMEZ-ARIZA et al., 2000a). De fato alguns autores utilizaram a distinção entre espécies borohidreto reativas e não reativas, fato este que levou à proposição de aplicar métodos analíticos para determinação de espécies toxicologicamente relevantes em alimentos, baseados na presunção de que estas espécies são hidreto reativas enquanto outras espécies presentes em alimentos, principalmente arsenobetaina e arsenoaçúcares seriam espécies não reativas (SCHMEISSER et al., 2004). No entanto este último enfoque pode ser confrontado devido à publicação em 2002 da presença de uma pequena resposta de arsenoaçúcares à geração de hidretos sem o emprego de decomposição pós-coluna (SANCHEZ-RODAS et al., 2002). Este fato foi confirmado mais tarde com o relato da determinação de quatro espécies de arsenoaçúcar mediante geração de hidretos pós-coluna e detecção por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) (SCHMEISSER et al., 2004). Entretanto, a identificação e quantificação de tioarsenoaçúcares ($(CH_3)_2$AsX-açúcar-R) onde X pode ser um oxigênio ou sulfeto e R= OH, PO_4, SO_3 ou -SO_4, ácido dimetilarsinoil acético DMAA, dimetilarsinoil etanol DMAE e um análogo sulfídrico do ácido dimetilarsenico DMAS (REGMI et al., 2007).

4.2.4 Espectrometria de Fluorescência Atômica

O emprego da fluorescência atômica como técnica analítica foi pioneiramente descrito por Winefordner e colaboradores no ano de 1964, os quais, no mesmo ano

publicam um artigo descrevendo a determinação de zinco, cádmio e mercúrio por espectrometria de fluorescência atômica (WINEFORDNER; STAAB, 1964; WINEFORDNER; VICKERS, 1964). Até então a fluorescência atômica era empregada para estudo da estrutura eletrônica dos átomos (BROWNER, 1974).

A fluorescência atômica consiste na excitação de átomos por fótons, para produzir átomos excitados que emitiram uma radiação durante um brevíssimo período de tempo (nano segundos), quando retornarem ao estado fundamental. A fonte de excitação pode ser uma fonte de linha estreita, onde a meia largura espectral da radiação será mais estreita do que a linha de absorção dos átomos do analito no atomizador; ou uma fonte contínua ou semicontínua, onde a meia largura espectral da radiação de excitação e maior do que a linha de absorção do analito no atomizador. A intensidade da fluorescência dependerá criticamente da intensidade da fonte de excitação, assim como da concentração dos analitos presentas nas amostras estudadas (WINEFORDNER, 1978).

A espectrometria de fluorescência atômica oferece maior sensibilidade e limites de detecção mais baixos, comparada com a espectrometria de absorção atômica convencional, principalmente para metais cujas líneas de ressonância fundamental recaem abaixo de 320 nm. Um bom enfoque para o uso de espectrômetros de fluorescência atômica é a introdução de amostras gasosas, que faz menos crítica a escolha do sistema de atomização. Assim a cromatografia gasosa e a geração química de vapor (CVG) consideram-se os sistemas ideais de introdução de amostras para AFS. Em geral, se empregam espectrômetros de fluorescência atômica não dispersivos com fotomultiplicadores sensíveis unicamente à radiação UV (não detectam a radiação solar), com resposta típica entre 160 e 320 nm com ou sem o uso de filtros óticos que reduzem a faixa espectral empregada.

Detectores de fluorescência atômica não dispersivos são simples e permitem a detecção simultânea de varias líneas do espectro (D'ULIVO et al., 2009). Em espectrômetros de fluorescência comerciais, como o PS Analytica, a atomização se realiza em uma chama, alimentada pelo hidrogênio proveniente da reação de geração dos hidretos com $NaBH_4$ concentrado 1,5-4% m/v, em meio fortemente ácido (geralmente 30% HCl). Para a manutenção desta chama se requer fluxos elevados de reagentes, 4,5 mL/mincom a conseqüente geração de grandes volumes de resíduos químicos. Dédina e colaboradores em 1998 desenvolveram o “Miniature Ar-H_2 Diffusion Flame” (MDF), que consistia na utilização de uma mistura 70/30 de argônio e hidrogênio respectivamente, obtendo assim uma chama miniaturizada, mais estável e com menor interferência que a chama dos atomizadores convencionais (DÉDINA et al., 1998).

4.2.5 Acoplamento da coluna de cromatografia líquida com o Espectrômetro de Fluorescência Atômica

Com o sistema LC-HG-AFS montado, procedeu-se à realização dos estudos para a obtenção da melhor sensibilidade do sistema. Para escolher as vazões do ácido e do redutor envolvidos na reação de geração dos hidretos, tomou-se como parâmetro o sistema convencional de operação do gerador das espécies voláteis, acoplado ao detector de fluorescência atômica, as vazões do ácido e do carregador de amostras correspondem a duas vezes a vazão do redutor, sendo estas 9 mL/min para os dois primeiros e 4,5 mL/min para o redutor respectivamente. Levando em consideração que, no sistema convencional estas vazões são imperativas, devido á necessidade de geração de grandes volumes de hidrogênio para a manutenção da

chama no detector de fluorescência atômica e, uma vez que no nosso sistema implementou-se um fluxo adicional de hidrogênio para tal fim, as quantidades de ácido e de redutor seriam estritamente necessárias para a geração das espécies voláteis. Uma vez que a quantidade de amostra injetada seria da ordem de, no máximo 100 μL, não há a necessidade de consumir tais volumes de reagentes. Por tanto, foram escolhidos para o bombeamento do ácido e do redutor, tubos de tygon® de diâmetros diametralmente inferiores aos empregados no sistema convencional, no entanto manteve-se a proporção 2:1 antes mencionada. Uma vez fixado o tamanho dos tubos de bombeamento a otimização das vazões empregadas levou-se à cabo por variação da freqüência de rotação da bomba peristáltica.

Os estudos de otimização do sistema foram levados a cabo empregando-se uma solução padrão de concentração 30 μg/L de As^{3+}, os seguintes parâmetros foram investigados:

- ✓ Vazão do gás hidrogênio implementado para a manutenção da chama no espectrômetro de fluorescência atômica.
- ✓ Vazão dos reagentes implicados no sistema, HCl, NaBH4 e da bomba cromatográfica.
- ✓ Vazão do gás de arraste (Argônio)
- ✓ Implementação de um fluxo auxiliar de gás de arraste
- ✓ Combinação dos parâmetros de sensibilidade do software de controle do espectrômetro de fluorescência atômica e da sensibilidade do próprio detector.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito das vazões de hidrogênio e argônio

Com a finalidade de evitar a produção de grandes volumes de resíduos líquidos, quando se faz necessária a manutenção da chama do espectrômetro de fluorescência atômica mediante altas vazões do ácido e do redutor, como mencionado na secção 4.2.5, implementou-se um fluxo adicional de hidrogênio. O controle da vazão do hidrogênio implementado no sistema se realizou, num primeiro passo, mediante um dos rotâmetros próprios do equipamento, os quais possuem graduação de 0 a 600 cm^3/min, com incremento de escala de 25 em 25 unidades. Uma vez que a vazão mínima requerida para manter acesa a chama no espectrômetro resultou entre 50 e 75 cm^3/min, decidiu-se adquirir um rotâmetro capaz de mensurar vazões menores para obter melhor ajuste e visualização da escala. Adquiriu-se então um rotâmetro com escala de 10 a 160 cm^3/min e incrementos de 10 cm^3/min calibrado para argônio.

A vazão mínima requerida para ligar a chama do espectrômetro de fluorescência, empregando o novo rotâmetro, resultou ser 70 cm^3/min. Entretanto, quando se introduz na câmara de separação argônio como gás auxiliar para um melhor transporte dos analitos separados para o detector verificou-se a extinção da chama por diluição do hidrogênio auxiliar. Experimentos subseqüentes revelaram que a vazão mínima de do hidrogênio auxiliar para manter a chama era de 80 cm^3/min, empregando argônio somente para limpeza da câmara de separação de até 1 L/min. Entretanto quando aplicada uma vazão de hidrogênio superior a 100 cm^3/min, perde-se qualquer sinal devido à saturação do detector. Por tanto, a vazão do hidrogênio auxiliar resulta um parâmetro crítico para a sensibilidade do sistema,

fato este que já foi relatado anteriormente (GOMEZ-ARIZA et al., 1998). A vazão ótima de trabalho para o gás hidrogênio auxiliar, resultou ser de 90 cm^3/min.

De igual modo que o gás hidrogênio implementado, o gás argônio empregado na câmara de separação para limpeza desta e transporte dos hidretos gerados, joga um papel importante na sensibilidade do sistema acoplado. Vazões muito baixas deste gás provocam um transporte ineficiente dos analitos para o detector, resultando em picos muito largos e, podendo verificar-se inclusive superposição destes picos cromatográficos. Por outro lado, quanto menor o volume de gás argônio, maior será a concentração de hidrogênio na chama do espectrômetro e, como já mencionamos no item 4.3.1, isto provoca uma saturação no detector. Entretanto, uma vazão muito elevada provoca perda de sensibilidade devido a um menor tempo de permanência dos analitos na chama do espectrômetro (fonte de excitação dos átomos), além disto provoca a diluição da concentração de hidrogênio levando a extinção da chama.

4.3.2 Efeito da vazão dos reagentes inseridos pós-coluna

A vazão dos reagentes empregados pós-coluna para as reações de geração dos hidretos voláteis joga também um papel importante na cinética de reação, limpeza da câmara de separação e conseqüentemente na sensibilidade do sistema. Uma vez decididas as medidas de tubos de bombeamento e, mantendo-se aproximadamente a relação 2:1 para as vazões de ácido e redutor respectivamente, mencionados na seção 4.2.5, procedeu-se à modificação das velocidades de rotação da bomba peristáltica entre 20 e 40 rpm (rotações por minuto), obtendo-se vazões de 0,8 a 1,6 mL/min para o ácido e de 0,5 a 1,0 mL/min para o redutor.

Sob estas condições houve uma melhora na intensidade do sinal quando aumentada a rotação da bomba até 25 rpm, mantendo-se significativamente invariável na faixa de 25 a 30 rpm, com decréscimo do mesmo acima deste valor. Esta perda de sensibilidade deve-se provavelmente ao fato de que velocidades de bombeamento muito elevadas implicam menor tempo de contato dos reagentes com as espécies emergentes da coluna cromatográfica, afetando a cinética da reação. Por outro lado, vazões muito baixas, resultam em menor tempo de limpeza do sistema resultando em uma junção das espécies separadas na coluna com superposição dos picos obtidos no cromatograma.

Entretanto, no estudo da vazão ótima de trabalho da bomba cromatográfica foram testados 1,0 e 1,5 mL/min para a fase móvel. Embora hajamos conseguido um menor tempo de análise quando aplicada a vazão de 1,5 mL/min, como podemos observar na Figura 4.2, sob estas condições obteve-se um maior erro na repetibilidade dos tempos de retenção das espécies, principalmente para o As^{5+}, o mais fortemente retido na coluna e, em alguns casos se verificou uma superposição dos picos correspondentes a DMA e MMA. A excelente repetibilidade dos tempos de retenção para a espécie As^{3+} observada nesta figura se deve á não retenção desta espécie na coluna cromatográfica empregada.

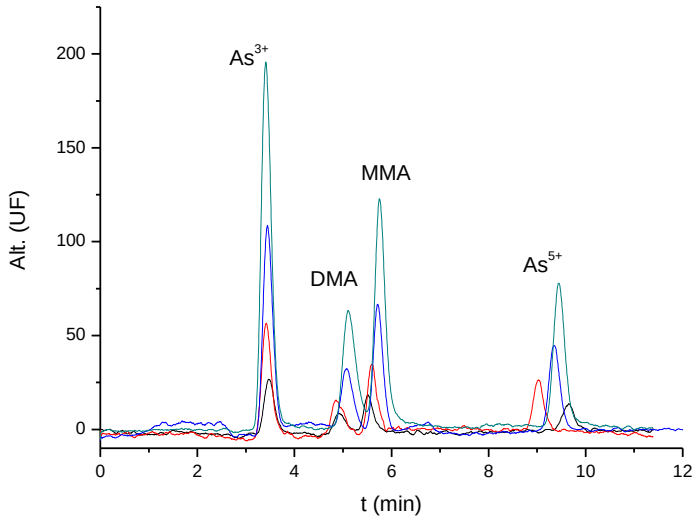


Figura 4.2 – Cromatograma de quatro espécies de arsênio, em diferentes concentrações, quando empregada uma vazão da bomba cromatográfica igual a 1,5 mL/min.

4.3.3 Efeito das combinações de ajuste da sensibilidade do detector

O espectrômetro de fluorescência atômica para análise de arsênio PSA Excalibur possui um resistor variável graduado na escala de 0 a 10 com subdivisões de 0,1 que permite modificar o ganho do sinal durante as análises visando melhorar a sensibilidade de detecção. Além deste dispositivo, chamado de “ganho fino do detector”, o software próprio do equipamento, para ajuste de parâmetros da análise como filtros de aquisição de dados, curva de calibração, identificação das amostras, diluições realizadas etc., permite também aumentar a sensibilidade do detector em 1(uma), 10 (dez), 100 (cem) ou 1000 (mil) vezes. Este recurso é chamado de “ganho grosso” do equipamento e o valor ajustado nele multiplica o valor ajustado no detector, conseguindo-se assim uma escala de sensibilidade (amplificação do sinal) de 0,1 a 10000.

Considerando que, quando aumentamos a sensibilidade do detector conseqüentemente incrementamos também a magnitude do sinal de fundo (ruído do sinal), com a finalidade de determinar as melhores condições para as análises cromatográficas realizadas durante esta trabalho, se procedeu a verificar a resposta do detector do espectrômetro de fluorescência atômica com diferentes combinações de amplificação de sinal. Se levássemos em consideração apenas os valores inteiros de ambos parâmetros, no mínimo teríamos 40 combinações, se fixou um número determinado de combinações, os quais se apresentam na Figura 4.3.

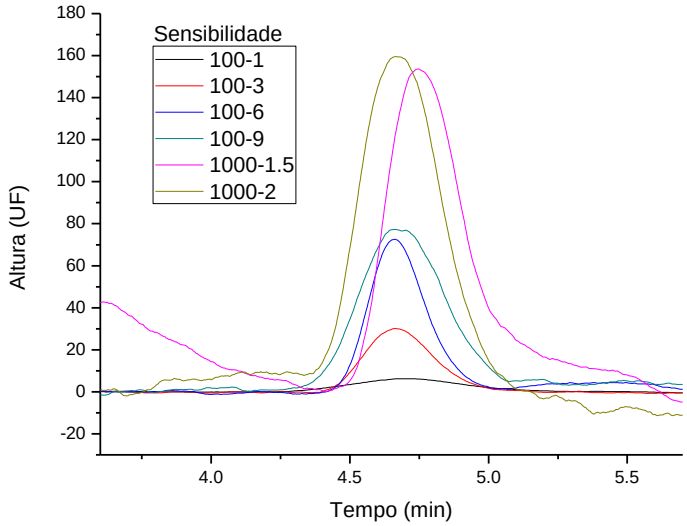


Figura 4.3 – Sensibilidade do detector de fluorescência atômica. Cromatograma de uma solução padrão de As^{3+} em concentração 10 μg/L indicando a variação na relação sinal ruído com as diferentes combinações de sensibilidade do detector empregadas, utilizando alça de amostragem de 100 μL.

Como esperado (Figura 4.3), a relação sinal/ruido aumenta consideravelmente com o aumento da faixa de amplificação do espectrômetro de fluorescência, o que permitiria atingir limites de detecção da ordem dos ng/L. Entretanto, também podemos observar uma ligeira instabilidade da linha de base

para valores de amplificação acima de 1000 onde, embora a razão sinal/ruído não se veja afetada, a linha de base forma um desenho de ondas ao longo do cromatograma. Assim, em caso de aparecer um pico quando a onda estiver no seu ponto máximo, teríamos perda de sinal por saturação do detector. Esta instabilidade se deve à elevada corrente elétrica induzida no detector quando se aumenta o seu ganho. Observados estes resultados, se procede a realizar todas as determinações cromatográficas com a combinação software/detector 100/9 (900 de amplificação).

Uma vez estabelecidas as melhores condições para a determinação das espécies formadoras de hidreto empregando o sistema acoplado LC-HG-AFS, se procedeu a análise dos extratos de amostras de camarão seco moído e liofilizado, obtidos por extração em banho de ultra-som empregando água como solvente.

Como esperado, as amostras de camarão e de tubarão não apresentaram espécies formadoras de hidreto. Entretanto, na Figura 4.4 se mostra um cromatograma em triplicata da separação das quatro espécies de arsênio estudadas, adicionadas em concentrações aleatórias ao extrato de camarão.

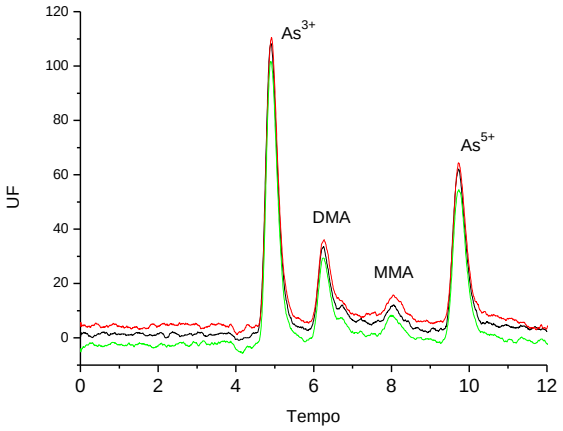


Figura 4.4 - Triplicata da separação de quatro espécies de arsênio, As^{3+}, DMA, MMA e As^{5+} pelo sistema acoplado LC-HG-AFS, empregando as condições de trabalho apresentadas na Tabela 4.1.

Na Tabela 4.1 são apresentados os parâmetros operacionais escolhidos para o funcionamento do sistema LC-HG-AFS, decorrentes dos resultados obtidos nos estudos prévios. Entanto que na Tabela 4.2 se apresentam os tempos de aparecimento de cada espécie no cromatograma assim como seus respectivos desvios.

Tabela 4.1 – Parâmetros de operação do sistema acoplado LC-HG-AFS.

Espectrômetro de Fluorescência Atômica	
Detector	Excalibur PSAnalytical
Comprimento de onda	193,7 nm
Largura de banda	20 nm
Corrente primaria	27,5 mA
Corrente do boost	35,0 mA
Vazão do H_2 auxuliar para formar a chama	90 (400,7 corrigido) mL/min
Geração de Hidretos	
Solução ácida	HCl 1,5 mol/L (1 mL/min)
Agente redutor	$NaBH_4$ 1,5% m/v em 0,1 mol/L de NaOH (0,6 mL/min)
Vazão do Ar da câmara de separação	600 mL/min (na camara de separação)
Vazão do Ar auxiliar	350 mL/min
Cromatografia Líquida	
Coluna	Hamilton PRP-X100 (250 x 4,1 mm i.d., partículas de 10 μm)
Temperatura da coluna	Temperatura do laboratório (23-26°C)
Vazão da fase movel	1 mL/min
Fase móvel A	12 mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4; pH 6,22
Fase móvel B	24 mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4; pH 6,22
Seqüência de Eluição	0-5 min A, 5-12 min B, 12-15 min A

Tabela 4.2 – Tempos de retenção de cada espécie de arsênio estudada quando empregada uma vazão constante de 1 mL/min.

Espécie	As^{3+}	DMA	MMA	As^{5+}
T de retenção (min)	4,898 ± 0,012	6,261±0,009	8,035 ± 0,038	9,726 ± 0,006

Os limites de detecção encontrados para as quatro espécies estudadas empregando este sistema acoplado, considerando 3σ foi de 2,10 μg/L para As^{3+}; 3,82 μg/L para DMA; 2,23 μg/L para MMA e 1,19 μg/L para As^{5+} respectivamente, expresados em concentrações de arsênio. Valores uma vez mais um pouco acima dos valores relatados anteriormente (GOMEZ-ARIZA et al., 1998). Entretanto o sistema mostrou-se satisfatoriamente robusto e sensível para as aplicações deste trabalho.

4.4 Conclusões

O sistema acoplado LC-HG-AFS mostrou-se robusto e sensível para as determinações de espécies de arsênio. A implementação de um fluxo auxiliar de hidrogênio para a manutenção da chama no espectrômetro de fluorescência atômica resultou de vital importância, não só na redução de volumes de resíduo gerados como também na sensibilidade do sistema devido à formação de uma chama mais estável. Em comparação com outras técnicas espectrométricas como ICP-MS ou ICP OES o espectrômetro de fluorescência atômica resulta mais barato e fácil de

manipular. Com tudo, a sensibilidade e os limites de detecção do sistema podem ser ainda melhorados.

5 Minimização dos Resíduos Gerados Durante a Pesquisa

Resumo

Nesta pesquisa foi utilizado um sistema de análises químicas com injeção seqüencial para a manipulação de micro-volumes de amostras e soluções padrão de espécies de arsênio, visando a redução de resíduos líquidos contendo arsênio na especiação por eletroforese capilar acoplada a um espectrômetro de massas com fonte de plasma. Foi desenvolvido um dispositivo com controle eletrônico para a injeção hidrodinâmica de pequenos volumes no capilar eletroforético atingindo-se precisões menores do que 2%. Este sistema foi otimizado para a determinação de cinco (5) espécies de arsênio em urina liofilizada e extratos de camarão empregando um volume de 50 μL da solução das amostras.

Abstract

Sequential injection analysis is proposed for managing micro-volumes of sample and arsenic species solutions for speciation analysis by capillary electrophoresis focusing on the reduction of hazardous waste residues. An electronically controlled hydrodynamic injector was projected to introduce micro-volumes of solutions prepared by SIA into the CE capillary with precision better than 2%. The determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, and arsenobetaine was performed from 50 uL volumes of lyophilized urine and extract of shrimp with the system hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE–ICP–MS).

5.1 Introdução

As metodologias analíticas para a especiação de arsênio tem sido e, provavelmente continuaram sendo, profundamente estudadas devido à alta toxicidade deste elemento. Entretanto o desenvolvimento de metodologias analíticas implica largas horas de investigação e ajustes dos parâmetros envolvidos na otimização destas metodologias. Assim sendo, incorre-se indefectivelmente na produção de grandes volumes de soluções de descarte ricas em arsênio. Compete então, a nós pesquisadores, incluir nestes procedimentos, metodologias que visem minimizar o volume de resíduos gerados, tanto durante a otimização dos processos analíticos como das análises em si.

Dentre as metodologias mais comumente usadas na análise por especiação encontramos a que inclui técnicas de separação, como são, por exemplo, a cromatografia líquida e a eletroforese capilar (LC e CE do inglês Liquid Chromatography e Capillary Electrophoresis respectivamente). A combinação destas duas técnicas de separação, com técnicas de detecção de alta sensibilidade como são a espectrômetria de massas e de emissão ótica com fonte de plasma (ICP-MS e ICP OES) tem sido amplamente empregada para especiação de arsênio (TERLECKA, 2005). No entanto, a derivatização para a volatilização das espécies separadas tem sido implementada com o intuito de melhorar a eficiência de transporte destes analitos para os detectores, (MAGNUSON et al., 1997a). A system combining capillary electrophoresis with hydride generation was successfully hyphenated to ICP OES for this purpose (SUÁREZ; GINÉ, 2005).

Além de apresentar alta resolução dos picos no eletroferograma e, a possibilidade de se terem a separação das espécies aniônicas e catiônicas numa

única análise, a eletroforese capilar apresenta a vantagem de necessitar μ L de amostras, com a conseqüente geração de baixos volumes de resíduos. Estas características da eletroforese capilar representam um importante rol considerando a instabilidade das espécies arsenito (As^{3+}) e arsenato (As^{5+}) em meio aquoso (HALL et al., 1999) entretanto implicam na necessidade de preparar diariamente as soluções padrão multi-espécies e a conseqüente produção de maiores volumes de soluções de descarte com alto teor de arsênio.

Um método não cromatográfico para a especiação de compostos de arsênio em amostras de peixes tem sido descrito, empregando a geração dos hidretos voláteis de arsênio e detecção por fluorescência atômica (HG-AFS) (CAVA-MONTESINOS et al., 2005). Entretanto, com estes procedimentos, além da necessidade de tratamentos matemáticos e estatísticos, geram-se grandes quantidades de resíduos líquidos com elevado grau de acidez e teores de arsênio. Considerando-se, que, para a geração dos hidretos voláteis das diferentes espécies de arsênio torna-se necessária a otimização de processos separados para cada espécie, além de mais uma etapa de digestão das amostras para a determinação do teor total de arsênio.

A preparação de soluções analíticas empregando sistemas de injeção em fluxo (FIA do inglês Flow Injection Analysis) em linha com os sistemas de detecção tem sido descrito anteriormente (HINDSON et al., 2004). Sistemas em fluxo com injeção seqüencial (SIA do inglês Sequential Injection Analysis) acoplados com eletroforese capilar têm sido propostos para efetuar injeção hidrodinâmica de pequenos volumes de amostra dentro do capilar eletroforético (FANG et al., 1999; KUBAN et al., 1999; WU et al., 2002; KULKA et al., 2006; HORSTKOTTE et al., 2007).

A principal vantagem dos sistemas SIA reside na sua flexibilidade e versatilidade para a automatização completa da pré-mistura de pequenos volumes de amostras e soluções padrão, com a possibilidade de manipulação de micro-volumes. Visando melhorar a versatilidade do pré-tratamento em linha das amostras e, a total automatização do sistema em combinação com a eletroforese capilar, foi descrito em 2002 um procedimento, aproveitando a miniaturização de um sistema SIA, para misturar micro-volumes de soluções (μSI) empregando um dispositivo Lab-On-Valve (LOV) (WU et al., 2002). Outros autores propuseram um sistema completamente automatizado combinando μSIA em linha com eletroforese capilar (μSIA-CE) empregando seringa de 100 μL para preparar diferentes misturas de adenosina e adenosina monofosfato com propósitos de calibração do sistema analítico (KULKA et al., 2006). Nesse trabalho reporta-se a injeção hidrodinâmica das amostras, soluções padrão e soluções para o recondicionamento do capilar. A conexão em linha de ambas técnicas requer a automatização completa do processo analítico incluindo o recondicionamento e limpeza do capilar eletroforético. Embora seja informado neste trabalho a injeção de 40 nL de amostra e uma precisão de 5% das áreas dos picos detectados por UV, não se reporta o volume necessário para preencher o sistema completo até o capilar.

Mais recentemente, (HORSTKOTTE et al., 2007) descrevem a completa automatização de um sistema SIA-CE para injeção de amostras e soluções padrão, assim como também das soluções requeridas para o condicionamento do capilar eletroforético. Estes autores reportaram a necessidade de 100 μL de solução para cada injeção no capilar.

Nesta pesquisa, a capacidade do sistema μSIA de manipular pequenos volumes foi explorada para a preparação *in-situ* de micro-litros de soluções padrão

contendo espécies de arsênio, visando empregar estas soluções seja, nos processos de calibração externa ou adição de padrão para identificação e quantificação das espécies. Estas soluções foram depositadas em pequenos recipientes de 200 µL para a sua posterior injeção hidrodinâmica no capilar eletroforético.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Sistema de Injeção Seqüencial

Um sistema de injeção seqüencial SIA Lab® (FIAlab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) foi empregado para preparar micro-volumes de soluções padrão mixtas de multi-espécies. O sistema SIA foi equipado com uma válvula de oito vias, uma seringa de vidro de 500 µL, uma bobina de de 30 cm de comprimento e 0,2 mm i.d. de poliéter éter cetona (PEEK do inglês polyether ketone). Capilares de PEEK de 10 cm de comprimento e 65 um i.d.foram utilizados para a conexão das vias da válvula do SIA com os recipientes contendo as soluções a serem misturadas para o preparo dos padrões.

5.2.2 Injeção Hidrodinâmica

O dispositivo para injeção hidrodinâmica similar ao descrito anteriormente por Lavorante e colaboradores (LAVORANTE et al., 2004) foi construído com um tubo de 200 µL (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e instalado numa plataforma em acrílico. Para favorecer a injeção hidrodinâmica foi acoplada ao sistema uma unidade controladora de gás, (DGU unit, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão)

conectada a um cilindro de argônio de 1 m^3 (Oxipira, Piracicaba-SP, Brasil). Para melhorar a precisão e minimizar possíveis erros sistemáticos devido ao operador foi desenvolvida uma interface com circuito eletrônico temporizado para controlar duas válvulas solenóides de três vias acopladas em sequencia (NResearch, Stow, MA, USA). Detector espectrofotométrico (LabAlliance, mod.500, State College, PA, USA) e provido de software cromatográfico (CSW 1.7, Data Apex Ltd., Praga, República Tcheca).

5.2.3 Interface CE-ICP-MS

O sistema de eletroforese capilar foi construído no laboratório empregando-se capilares de sílica fundida de 75 µm i.d. (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA) , como eletrodos foi empregado 3,5 cm de fios de platina de 0,3 mm de diâmetro (Loccus, Biotech, São Paulo, Brazil) conectados a uma fonte de alta voltagem (CZE-1000R, Spellman, Hauppauge, NY, USA).

A interface CE-ICP-MS foi acoplada usando uma peça de PEEK em forma de T (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) através da qual passa o capilar eletroforético .

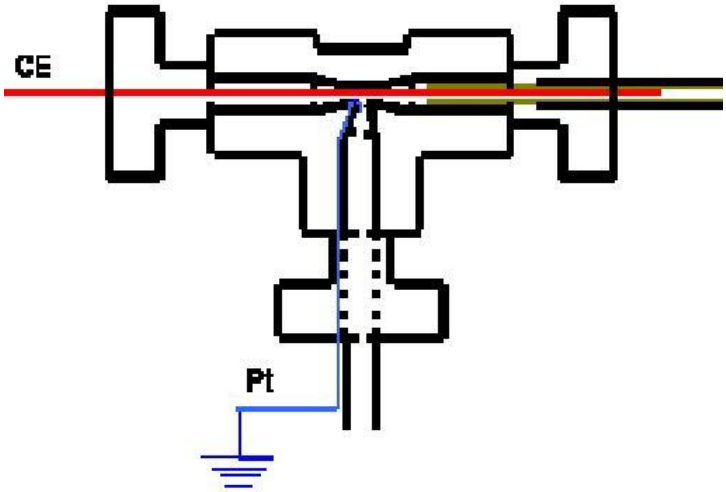


Figura 5.1 – Peça em formato T para o acoplamento CE-ICP-MS. Observa-se nesta figura a passagem do capilar através dela, além da inserção perpendicular ao capilar para a platina e o tubo para bombeamento da solução auxiliar.

Foi usada uma bomba peristáltica de oito canais (Ismatec, mp-8, Zurich, Switzerland). Um tubo de polietileno de 3 cm de comprimento e 0,5 mm i.d. , uma conexão em T e um nebulizador de alta eficiência (HEN Meinhard, Santa Ana, CA, USA), o qual, foi inserido numa câmara de nebulização do tipo ciclônica. O ICP-MS (Element 1, Finnigan MAT, Bremen, Germany), foi empregado para a detecção das espécies de arsênio.

5.3 Procedimento Experimental

A manipulação das soluções no sistema SIA foi otimizada de forma independente da separação eletroforética. Esta configuração independente de ambos os sistemas foi adotada visando reduzir o volume de soluções de descarte contendo arsênio e, a possibilidade de reduzir o tempo da análise por superposição

dos processos de preparo das soluções a serem injetadas no capilar e o recondicionamento do mesmo.

O sistema proposto foi empregado para analisar espécies de arsênio em amostras de camarão e urina por acoplamento de um sistema de eletroforese capilar ao espectrômetro de massas.

5.3.1 Injeção Seqüencial para preparo das soluções padrão

O injector sequencial esquematizado na Figura 5.2, foi programado para preparar diariamente 500 µL de soluções padrão mistas na concentração de 200 µg/L para cada espécie.

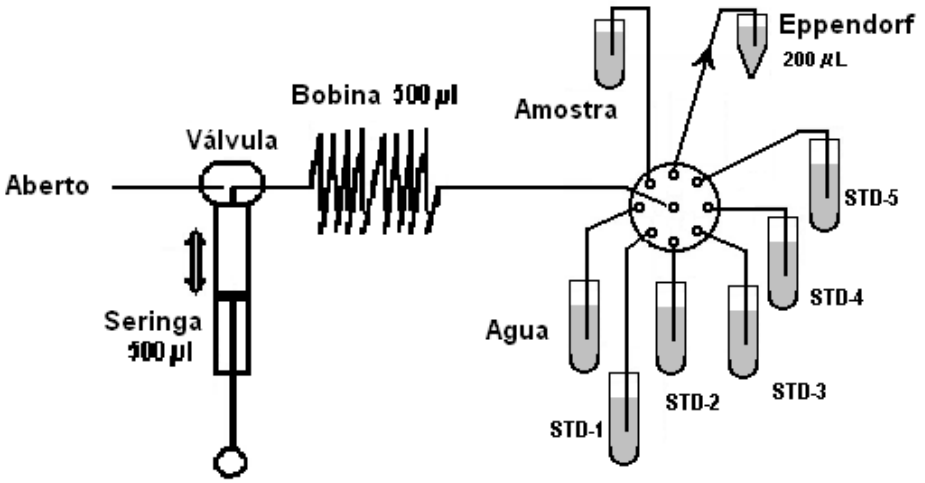


Figura 5.2 - Representação esquemática do sistema SIA, com uma bomba de seringa de 500 µL e uma bobina para mistura das soluções também de 500 µL e o recipiente para a posterior injeção hidrodinâmica de 200 µL.

Na seqüência de ações programadas as soluções aspiradas pela bomba de seringa do SIA desde seus respectivos recipientes foram misturadas na bobina de mistura e, revertendo a direção do fluxo do bombeamento, foram posteriormente depositadas nos tubos Eppendorf® de 200 µL. Estes tubos de 200 µL foram posteriormente encaixados no injetor do CE.

As soluções de padrões secundários foram preparadas pelo SIA e a partir delas, devidamente misturadas, foram preparadas as soluções multi-espécies necessárias para o ajuste dos parâmetros eletroforéticos. A adição das soluções de espécies individuais foi efetuada nas amostras, tanto para propósitos de identificação das espécies nas amostras como para quantificação das mesmas.

5.3.2 Introdução de amostras no CE

Um injetor hidrodinâmico eletrónicamente controlado foi projetado para o sistema de eletroforese capilar segundo o esquema apresentado na Figura 5.3. O injetor foi construído em acrílico. Na parte inferior da mesma encontra-se o encaixe para o recipiente contendo a amostra ou o eletrólito segundo corresponda e, este recipiente por sua vez consiste em um tubo Eppendorf® de 200 µl. A peça em acrílico apresenta também três perfurações de finíssimo diâmetro (formando três vias de comunicação que convergem no encaixe do tubo Eppendorf®), estas correspondem às entradas do capilar eletroforético, do fio de platina e do gás para a pressurização. O capilar eletroforético e o fio de platina estarão submersos na solução contida no tubo. Por sua vez a entrada do gás estará conectada com as válvulas solenóides do sistema de controle eletrônico através de um tubo de polietileno de 0,8 mm i.d. e o fio de platina conectado com a fonte de alta tensão.

Para os estudos de precisão do volume injetado no capilar empregou-se uma solução 100 mmol/L de cisteína detectado à 214 nm segundo descrito anteriormente (Lavorante, Gervasio *et al.*, 2004).

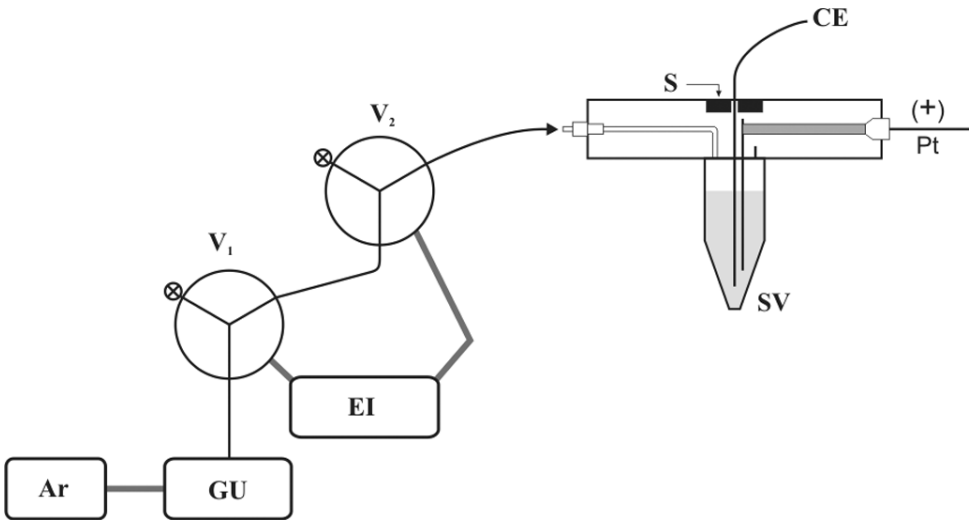


Figura 5.3 - Esquema do injetor hidrodinâmico construído em acrílico, onde CE é o capilar eletroforético, S um septo que permite fixar o capilar impedindo vazamentos no sistema, SV é o recipiente de 200 uL e Pt o eletrodo de platina. À esquerda da figura se apresenta o sistema controlado eletronicamente para a injeção temporizada onde V1 e V2 são as válvulas solenóide conectadas em linha, EI o circuito eletrônico, GU o controlador de pressão do gás e Ar o cilindro de argônio.

Para estudos dos parâmetros de pressurização do recipiente para injeção da amostra no capilar foram empregadas 5, 10 e 20 kPa controlados pela unidade DGU, durante 5, 10 e 20 segundos controlados pelo circuito integrado IC 555 do circuito eletrônico esquematizado na Figura 3.2, apresentada no capítulo 3, item 3.3.1.

Outro parâmetro investigado para este injetor foi a influencia do volume de solução contida no recipiente. Para tal fim os recipientes foram carregados com 50 e 60 µL da solução padrão de cisteína e se realizaram 12 injeções aplicando pressões

de 5 e 10 kPa. A repetibilidade das injeções foi avaliada aplicando o teste chi-quadrado (χ^2) para comparar as áreas dos picos obtidos para cada injeção.

5.3.3 Separação das espécies e recondicionamento do capilar

O acondicionamento inicial do capilar eletroforético foi realizado mediante a injeção em seqüência das soluções HCl 1 mol/L, água, NaOH 0,1 mol/L e solução tampão respectivamente durante 10 minutos cada uma, empregando o modo de injeção não temporizado do circuito eletrônico e aplicando uma pressão de 15 kPa. A cada cinco separações eletroforéticas foi realizado um recondicionamento simples injetando as soluções empregadas no acondicionamento inicial, na mesma seqüência, durante 30 s cada uma, seguidas pela injeção do tampão eletroforético durante 1 minuto a uma pressão de 25 kPa antes da injeção da próxima amostra.

A separação eletroforética das espécies arsenito (As^{3+}), arsenato (As^{5+}), mometilarsênio (MMA) e dimetilarsênio (DMA) evaluou-se empregando uma solução padrão de concentração 10 mg/L de cada espécie injetada a 10 kPa durante 5 segundos. A repetibilidade do sistema foi avaliada em função dos tempos de migração e as áreas dos picos de cada espécie após cinco separações eletroforéticas com a injeção de NaOH 0,1 mol/L e tampão após cada separação.

Os parâmetros empregados para a separação eletroforética acoplada ao espectrômetro de massas são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Parâmetros operacionais para as condições de trabalho empregando o acoplamento CE-ICP-MS.

Voltagem aplicada no CE (kV)	-15
Solução eletrolítica (Fosfato) (mmol/L)	20
Modificador de fluxo eletroosmótico TTAB (mmol/L)	1,5
Solução auxiliar HNO3 (mmol/L)	0,5
Vazão da solução auxiliar na interface CE–ICP (µL/min)	120
Comprimento do capilar (cm)	45
Energia aplicada no plasma (kW)	1,3
Vazão do argônio do plasma (L/min)	12
Vazão do argônio de nebulização (mL/min)	100
Massa monitorada no modo “single íon”	75

5.3.4 Otimização dos parâmetros na interface CE-ICP-MS

Para a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para a interface CE-ICP-MS, primeiramente foi injetada, através do capilar e a uma pressão constante de 25 kPa, uma solução padrão de As^{3+} de concentração 100 µg/L, enquanto a solução auxiliar foi bombeada a uma vazão constante de 100 µL/min com o intuito de simular a diluição sofrida pelos analitos neste tipo de interfaces. Enquanto isto o espectrômetro de massas era operado no modo “single íon” monitorando sinal da razão m/z 75.

A interface CE foi conectada a um nebulizador de alta eficiência inserido numa câmara de nebulização ciclônica e a pressão de nebulização foi ajustada para 800 kPa fornecendo uma vazão nominal de aspiração de 100 µL/min. A vazão da solução auxiliar foi ajustada para 120 µL/min com o intuito suprir a demanda de aspiração do nebulizador, sem incorrer em erros devido à aspiração da solução

contida dentro do capilar, o que ocasionaria um menor tempo de separação mais provavelmente com picos menos definidos; ou retardar a separação das espécies devido a uma aspiração insuficiente da solução auxiliar provocando a entrada desta solução dentro do capilar o que se conhece como “Back Pressure”.

5.4 Resultados e Discussão

O injetor hidrodinâmico eletronicamente controlado desenvolvido durante esta pesquisa permitiu a introdução de volumes controlados de amostra no capilar eletroforético mediante o ajuste da pressão aplicada e do tempo de abertura das válvulas solenóides para a pressurização do recipiente contendo a amostra, inserido no injetor. Os efeitos de ambos parâmetros sobre o volume de amostra injetado são apresentados na Tabela 5.2. Como observado nesta tabela o volume injetado aumenta linearmente com o aumento do tempo de injeção, estes resultados encontram-se em concordância com os resultados apresentados por Altria (1996). Os dados desta tabela revelam também que variações no tempo de injeção resultam em maior precisão do que variações na pressão aplicada. Estes resultados confirmam a robustez do circuito eletrônico em termos de precisão no tempo de injeção. Considerando que o volume de amostra injetada no capilar eletroforético deve ser menor do que 10% do volume total do mesmo e que volumes maiores injetados afetam a estabilidade da corrente elétrica (ALTRIA, 1996), desprende-se dos resultados apresentados na Tabela 5.2 que unicamente 5 (cinco) combinações de pressão e tempo aplicado podem ser empregadas visando respeitar os limites de volume injetado.

Tabela 5.2 - Volumes em nL injetados no capilar empregando as diversas combinações de pressão aplicada e tempo de injeção. (n=3)

Pressão (kPa)	5	10	20	R^2
Tempo de injeção (s)				
5	46 ± 1	99 ± 1	230 ± 6	0.9972
10	142 ± 2	297 ± 8	662 ± 16	0.9985
20	327 ± 7	674 ± 17	1429 ± 19	0.9996
R^2	0.9999	0.9998	0.9997	

O fato de que na eletroforese capilar são empregados volumes muito pequenos de solução, induziu-nos a supor pequenas variações de volume no recipiente contendo as amostras a serem injetadas acarretaria variações no volume das mesmas injetado no capilar. No entanto os resultados revelaram que variações de volume de até 20% no interior do recipiente da amostra não apresentaram variações significativas no volume de amostra injetado, com o qual pudemos demonstrar a robustez do injetor hidrodinâmico desenvolvido.

Embora haja a necessidade de se reduzir o volume de resíduos líquidos contendo arsênio, o volume de solução dentro do recipiente deve ser suficiente para manter imersos a platina e o capilar eletroforético para garantir a estabilidade da corrente elétrica durante a separação. O eletrodo de platina e o capilar eletroforético, submersos na solução tampão, não devem ficar em contato entre si.

Comparando com outros trabalhos empregando o acoplamento em linha SIA-CE, embora o volume injetado tenha sido apenas 50 µL, o volume total para preencher o sistema foi de 100 µL, o que leva a pensar que a cada injeção 50 µL de amostra são descartados (HORSTKOTTE et al., 2007).

A otimização do sistema SIA para preparar as soluções de forma independente à separação eletroforética e dos processos de recondicionamento do capilar, possibilitou a operação simultânea de ambos sistemas, minimizando-se o tempo de análise como assim também os riscos de contaminação.

O volume de solução eletrolítica no recipiente de injeção no capilar foi de 50 µL, volume suficiente para mergulhar o eletrodo e o capilar nela garantindo o contato elétrico do sistema eletroforético. Esta solução prove os eletrólitos necessários para que ocorra a eletroforese, entretanto alguns íons têm mobilidade eletroforética maior que outros, o que provoca um empobrecimento dos mesmos no volume residual. Por esses motivos deve ser substituída freqüentemente, o que em nossos experimentos ocorreu a cada três separações eletroforéticas, gerando-se um volume de descarte menor do que os volumes descartados quando empregadas configurações em linha FIA-CE ou SIA-CE.

Os parâmetros envolvidos na separação eletroforética das espécies de arsênio detectadas a 185 nm e, a repetibilidade do volume de amostra injetado no capilar eletroforético são apresentados na Tabela 5.3. Os resultados apresentaram um desvio padrão relativo (SRD) menor do 1,6% para o tempo de migração e menor do que 2,6% para as áreas dos picos.

Tabela 5.3 - Tempos de migração e áreas dos picos calculados após 5 (cinco) injeções, detectadas a 185 nm

As specie	Migration time (s)	Peak area (mV . s)
MMA	1,533 ± 0,021	546,54 ± 12,68
As(III)	1.707 ± 0,015	153,07 ± 3,95
As(V)	2,053 ± 0,032	261,29 ± 6,53
DMA	2,190 ± 0,031	367,27 ± 8,08

Quando se aplica injeção hidrodinâmica se injeta no capilar uma porção da amostra, a relação das espécies na amostra se mantém na alíquota injetada. No entanto quando se aplica injeção eletrocinética, ocorre uma discriminação de espécies em função de suas mobilidades eletroforéticas, deste modo a amostra se empobrece nas espécies com maior mobilidade eletroforético a cada injeção realizada. A repetibilidade do volume de amostra injetado no capilar eletroforético e, a precisão do sistema injetor em função da variação de volume no recipiente, permitiu a reutilização de um mesmo recipiente contendo a amostra para realizar repetidas injeções, uma vez que a composição da solução não se verá modificada quando empregamos injeção hidrodinâmica. Este fato apresenta-se em absoluta concordância com o intuito de diminuir os volumes de resíduos gerados.

A vantagem apresentada na manipulação do sistema CE-ICP-SFMS, de forma independente do sistema SIA para o preparo das soluções a serem analisadas, foi a possibilidade de determinar espécies de arsênio em extratos de amostras naturais devido ao elevado poder de detecção do SFMS, além da geração de reduzidos volumes de resíduos. Empregando esta combinação de técnicas, o volume de resíduo contendo arsênio gerado após análise de 10 amostras foi de 1,5 mL, dos quais aproximadamente 185 µL representam a solução multiespécie empregada para otimizar a separação eletroforética, 240 µL correspondem as soluções das espécies individuais empregadas para preparar as soluções multiespécies e otimizar o processo de adição de padrão, e o restante corresponde ao volume de água empregado para lavar o sistema SIA.

O eletroferograma apresentado na Figura 5.4 corresponde à análise de uma amostra de urina liofilizada contaminada com 200 µg/L de MMA e arsenato (As^{5+}). A

separação das quatro espécies de arsênio apresentou-se com boa resolução em um tempo inferior aos 5 minutos.

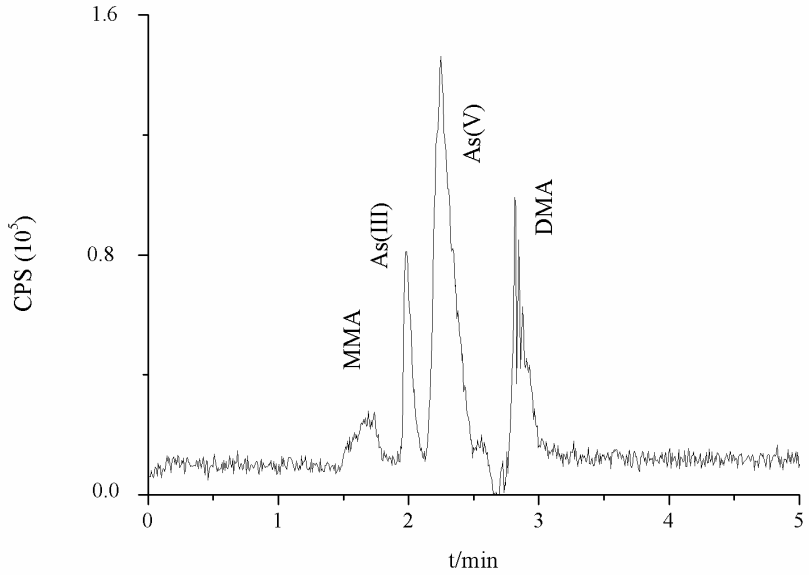


Figura 5.4 - Eletroferograma de uma amostra de urina liofilizada contendo arsenito (As^{3+}), arsenato (As^{5+}), ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). 200 µg/L de As^{5+} e DMA foram adicionados à amostra.

Um extrato aquoso de camarão também foi analisado encontrando-se no mesmo principalmente arsenobetaina, outras espécies de arsênio não foram detectadas nestes extratos. Na Figura 5.5 se apresenta um eletroferograma do extrato de camarão contaminado com 200 µg/L de arsenato (As^{5+}).

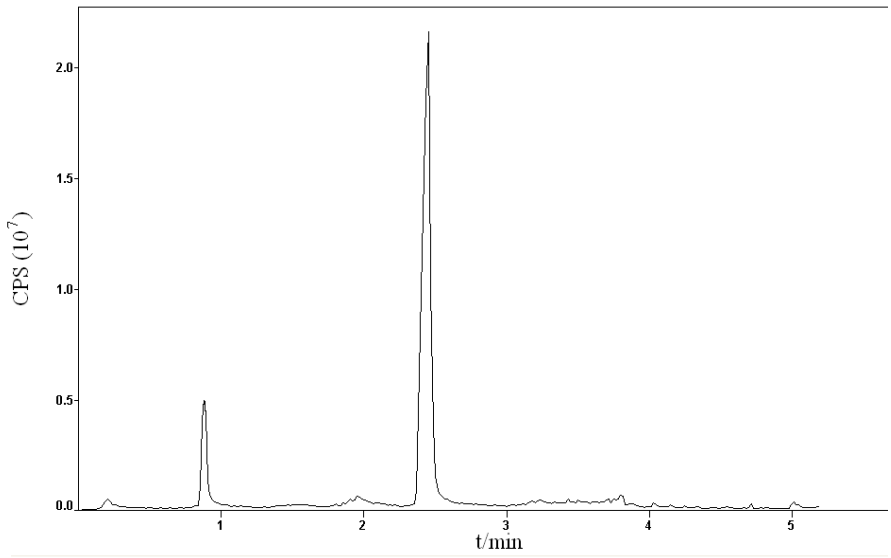


Figura 5.5 - Eletroferograma de um extrato de camarão pelo sistema CE-ICP-MS detectado na razão m/z= 75. De esquerda para a direita os picos correspondem à arsenobetaina e ao arsenato (As^{5+}) adicionado respectivamente.

5.5 Conclusões

A programação do sistema SIA para manipular micro-volumes de amostras e soluções padrão das espécies de arsênio, operando em forma independente da separação eletroforético, assim como a miniaturização do dispositivo utilizado para a injeção hidrodinâmica das soluções no capilar eletroforético, possibilitou a redução significativa do volume de resíduos contendo arsênio gerado durante o procedimento analítico.

A implementação do sistema SIA para prepara *in-situ* micro-volumes de soluções padrão e otimizar a adição de padrão nas amostras apresentou resultados satisfatórios. Este procedimento permitiu ademais a redução considerável (em torno de 87%) dos volumes resíduos de arsênio gerados durante o preparo dos padrões.

Outra vantagem deste sistema apresentado foi o desenvolvimento do micro-injetor hidrodinâmico para eletroforese capilar que possibilitou a injeção precisa e reprodutível de nanolitros de solução no capilar eletroforético. Além disto, os eletroferogramas apresentaram boa resolução e baixa dispersão dos picos separados num tempo menor do que 5 minutos. Por outro lado o emprego de um nebulizador de alta eficiência (HEN) inserido numa câmara ciclônica de nebulização, possibilitou a melhoria na eficiência de transporte das espécies separadas para o plasma do MS.

6 Recuperação dos Resíduos Gerados Durante a Pesquisa

Resumo

As soluções de descarte resultantes da análise de especiação de arsênio, empregando geração dos hidretos com birohidreto de sódio ou potássio, apresentam elevadas concentrações de boro, principalmente na forma de ácido bórico. Por outro lado, estas soluções apresentam resíduos de arsênio, provavelmente devido a tempos de reação muito curtos, diferenças na cinética de reação de cada espécie estudada ou o emprego de concentrações elevadas nos processos de otimização dos métodos de análise. Neste trabalho, se realizou a remoção de boro e arsênio dos resíduos líquidos gerados durante as pesquisas analíticas. Para a remoção de arsênio se utilizou a técnica de extração no ponto nuvem, entretanto a remoção de boro se realizou mediante a precipitação por mineralização hidrotérmica com hidróxido de cálcio.

Após a otimização dos procedimentos de remoção, as soluções de descarte laboratoriais foram submetidas a tratamento para a remoção dos respectivos elementos químicos. Finalmente os resíduos líquidos foram analisados por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma (ICP OES). A comparação dos níveis de arsênio e boro entre as soluções tratadas e não tratadas evidenciou satisfatórias porcentagens de remoção.

Abstract

Waste solution from arsenic speciation analysis in which hydride generation method with sodium or potassium boron hydride are employed presents high concentration of boron, mainly as boric acid. As well, these solutions probably contains some arsenic residues, perhaps due to short time of reactions, disparity on the reactivity of each specie or high concentration of those species used during analytical performance processes. In this work, the recovery of arsenic and boron from laboratories waste solutions after analytical developments is carried out. Meaning decontamination procedures, cloud point extraction was employed as a method for recovery of arsenic from these solutions. Also, boron precipitation by hydrothermal mineralization with calcium hydroxide was carried out.

After optimization of the complexation and extraction conditions, waste solution was treated by submitting its to this procedure. The amount of arsenic and boron in treated and non-treated waste solution was analyzed with Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES). The comparison of arsenic and boron levels between both solutions showed satisfactory percentages of extraction.

6.1 Introdução

O volume de resíduos gerados durante as análises de especiação química costuma ser muito elevado. Quando empregamos técnicas de separação como a cromatografia líquida ou a eletroforese capilar, acopladas com detectores como espectrômetros de massas com fonte de plasma, existe a necessidade de se manter vazões dos reagentes em torno a 1 ou 2 mL/min, para suprir a demanda dos nebulizadores empregados na interface destes sistemas acoplados. Se considerarmos que a eficiência de nebulização para a maioria dos nebulizadores comumente utilizados encontra-se em torno de 5%, ou seja, apenas 5% do líquido nebulizado atingirá a fonte de excitação e, conseqüentemente o 95% restante virará impreterivelmente lixo. Isto é 95 % do arsênio empregado para preparar as soluções padrão ou presente nas amostras estará sendo descartado como resíduos líquidos.

Por outro lado, quando empregamos derivatizações pós-coluna para geração de espécies voláteis e, em ocasiões, prévio a este, mais um passo para a decomposição das espécies não geradoras de hidretos, aumenta-se o número de reagentes implicados e, por conseguinte a quantidade de resíduos gerados aumentará ainda mais. Entretanto, por se tratar esta de uma técnica de separação de fases, na qual as espécies voláteis geradas são separadas da fase líquida e transportadas para a fonte de excitação, todos os reagentes líquidos envolvidos no processo da análise constituirão as soluções de descarte. A técnica de geração dos hidretos voláteis mediante a reação entre o borohidreto de sódio ou potássio em meio ácido constitui uma das técnicas mais comumente usadas para a produção de espécies voláteis de arsênio. Embora as espécies orgânicas de arsênio, como arsenobetaina, arsenocolina, arsenoaçucares e arsenolipideos constituem espécies

que não formam hidretos voláteis na reação com borohidreto de sódio, estas espécies são usualmente, após a separação cromatográfica, transformadas em espécies capazes de formar hidretos mediante reações em linha como oxidação ou foto-oxidação (HANSEN et al., 1992; LOPEZ et al., 1993; ZHANG et al., 1996a, b; BURGUERA; BURGUERA, 1997; SLEJKOVEC et al., 2001). Entretanto, recentemente foi reportada a geração de hidretos de arsênio a partir de arsenoaçúcares por reação direta com o borohidreto de sódio sem prévio tratamento de degradação das mesmas (SCHMEISSER et al., 2004; REGMI et al., 2007).

Subseqüentemente, resíduos líquidos derivados de processos analíticos de especiação, constituídos por várias etapas de derivatização, podem conter resíduos de arsênio, provavelmente devido a tempos de reação muito pequenos como para completar a estequiometria total da reação, somados às concentrações elevadas dos padrões empregadas durante as etapas de otimização da técnica desenvolvida e, às diferenças na cinética de reação de cada espécie no processo de formação dos hidretos. Por outro lado, estas soluções devem conter também elevadas quantidades enxofre, provenientes da utilização do persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) empregado nos processos de foto-oxidação das espécies orgânicas de arsênio e, grandes quantias de boro, geralmente na forma de ácido bórico, proveniente da volatilização das espécies com borohidreto de sódio. Amplamente distribuído no meio ambiente, principalmente na forma de ácido bórico ou sais de borato, embora considerado um elemento essencial, a diferença entre a essencialidade e a toxicidade deste elemento apresenta-se muito estreita. O excesso de boro proporciona efeitos negativos à saúde humana, aos animais e aos vegetais, por exemplo, o limite tolerável de boro para cítrus e alguns cereais de interesse comercial encontra-se em torno a 2 ou 3 mg/L, por outro lado a União Européia

recomenda um limite tolerável de boro em água potável de 0,3 mg/L (ITAKURA et al., 2005).

De tal modo, além de processos robustos e eficientes para análise de especiação, encontramo-nos com a necessidade de implementar ou desenvolver métodos que nos permitam recuperar, se não a totalidade, pelo menos grande parte do resíduo gerado no processo todo, seja quando empregamos análise de rotina ou realizamos pesquisa para desenvolvimento de novas técnicas analíticas.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Reagentes e soluções

Nesta etapa da pesquisa, um tratamento para recuperação de resíduos de arsênio e boro foi aplicado às soluções de descarte geradas durante a análise de especiação de arsenito (As^{3+}), arsenato (As^{5+}), ácido monometilarsônio (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), por geração de seus hidretos voláteis mediante a reação com borohidreto de sódio em meio ácido, após a separação eletroforética. Dentre os ácidos presentes nestas soluções de descarte encontram-se ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido tioglicólico.

Soluções estoque 20% m/v de Dietilditiofosfato de amônia (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, USA), empregado como complexante e, 5% m/v de Triton® X-114 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) empregado como surfactante.

Solução 5 mol/L de ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) com uma resistividade de 18,2 MΩ cm.

Hidróxido de cálcio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

6.2.2 Equipamentos

Para os procedimentos de extração do arsênio pela técnica de extração no ponto nuvem e de boro por co-precipitação com hidróxido de cálcio, foram empregados tubos de digestão de 50 ml.

As temperaturas necessárias para os respectivos processos de extração de arsênio e boro foram atingidas empregado um bloco de digestão da marca Tecnal com controle de temperatura (Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil).

Os teores de boro e arsênio nas soluções de descarte, antes e depois dos respectivos tratamentos aplicados para recuperação destes elementos foram determinados mediante um espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma indutivo (ICP OES), Perkin Elmer, modelo Optima 3000 com vista axial e radial.

6.2.3 Recuperação de arsênio

A recuperação do arsênio presente nas soluções de descarte laboratoriais foi realizada por aplicação do método de extração por ponto nuvem (CPE: do inglês Cloud Point Extraction). Devido a sua relativa simplicidade, desde as primeiras publicações aplicadas na determinação de manganês e zinco (GOTO et al., 1977; WATANABE; TANAKA, 1978), esta técnica tem se transformado nos últimos anos num dos principais métodos de pré-concentração e remoção para aplicação em diversas áreas como ambiental, clínica, geológica e de alimentos dentre outras (SILVA et al., 2006).

Os agentes surfactantes (ou tensoativos, também denominados detergentes) podem formar, em solução aquosa, agregados coloidais denominados micelas. A concentração mínima do surfactante requerida para a formação destas micelas denomina-se concentração micelar crítica (CMC) e, neste ponto haverá um equilíbrio entre a concentração das micelas formadas com os monômeros do surfactante em solução (QUINA; HINZE, 1999).

A metodologia de extração no ponto nuvem consiste no ajuste de certas condições do sistema, de forma a atingir a concentração micelar crítica CMC, seja com modificação da temperatura ou pressão, ou até mesmo a adição de uma substância apropriada a uma solução aquosa de um surfactante, provocando a formação de micelas as quais apresentam uma face turba, o que se conhece como ponto nuvem. Neste ponto a solução original se divide em duas fases, um pequeno volume rico em surfactante, contendo os elementos de interesse retidos nas estruturas micelares e, a fase aquosa empobrecida nos analitos separados (BEZERRA et al., 2005).

Neste trabalho, a extração no ponto nuvem foi empregada para a descontaminação das soluções de descarte, produzidas durante as pesquisas analíticas de especiação de arsênio e geração de seus respectivos hidretos mediante a reação com borohidreto de sódio em meio ácido. Tomaram-se como base os procedimentos empregados por Da Silva e colaboradores para determinação de arsênio em água do mar (DA SILVA et al., 2000).

Alíquotas de 40 mL das soluções de rejeito foram colocadas em tubos de digestão de 50 mL, antes da adição do complexante DDTP procedeu-se à acidificação da solução para pH 0,5 com HCl. Uma vez acidificadas as soluçõese, adicionou-se alíquotas de DDTP a fim de atingir concentrações finais de 1,0; 1,5 e

2,0 % m/v do complexante, com o intuito de determinar as melhores condições para a maior extração possível do arsênio presente nestas soluções, mantendo-se a concentração do surfactante adicionado (Triton X-114) em 0,05% m/v. Todos os tubos foram completados a volume de 50 mL e colocados em bloco de digestão até atingir uma temperatura de 40°C, mantendo esta durante uma hora. Após este procedimento os tubos contendo as soluções foram deixados a temperatura ambiente durante 12 horas, ao termino deste período, os tubos foram introduzidos em banho de água com gelo com a finalidade de incrementar a densidade dos precipitados e, facilitar à separação de ambas as fases mediante inversão dos tubos.

Finalmente os precipitados separados (~0,5 mL) para cada uma das concentrações empregadas do complexante foram digeridos com 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%. As soluções digeridas foram analisadas por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma (ICP OES) para determinação do arsênio extraído.

6.2.4 Recuperação de boro

O ácido bórico é uma importante fonte de boro utilizado na indústria em inúmeros processos, por tanto são gerados a cada dia altíssimas quantias de soluções de descarte com elevadas concentrações de boro. Por tanto há uma necessidade de contar com técnicas de recuperação que possam efetivamente remover o boro destas soluções. Varias técnicas têm sido propostas para a remoção do boro em águas residuais industriais, embora muitas delas apresentem algumas importantes desvantagens. Por exemplo, a co-precipitação com hidróxidos metálicos aparece como ineficiente e ecologicamente pouco efetiva devido à baixa taxa de

remoção e necessidade de grandes quantias de hidróxidos. A evaporação-cristalização apresenta-se efetiva unicamente sob condições de elevadíssimas concentrações de boro. A extração por solventes requer a utilização de alguns reagentes muito caros além da maioria deles serem tóxicos. A remoção de boro por intercambio iônico, embora seja uma das técnicas mais eficientes, requer processos de regeneração das resinas tão freqüentes que permite o tratamento somente de pequenos volumes de rejeitos. Outras das técnicas mais empregadas são, a osmose reversa e a ultra-filtração, embora apresentem elevados custos de manufatura e manutenção das membranas empregadas (ITAKURA et al., 2005).

Para a recuperação de boro das soluções residuais geradas nesta etapa da pesquisa, foi empregada a precipitação por mineralização hidrotérmica empregando hidróxido de cálcio [$Ca(OH)_2$], descrita por (ITAKURA et al., 2005), estes autores removeram mais de 99% do boro dissolvido em água, artificialmente preparada em laboratório a uma concentração de 500 mg/L de boro.

O tratamento hidrotérmico consistiu na adição de 3 gramas de hidróxido de cálcio, e 1,5 gramas de ácido fosfórico a cada 30 mL da solução de descarte, posteriormente os recipientes foram aquecidos a 130°C durante 14 horas, posteriormente foram esfriados a temperatura ambiente durante uma hora. Após separação os sobrenadantes foram analisados por espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma ICP OES. Segundo os autores deste trabalho de referência, o precipitado obtido pelo tratamento hidrotérmico proposto corresponde a um minério natural de boro.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Extração de arsênio

Como observado na Figura 6.1, o incremento na concentração do complexante DDTP de 1% para 1,5% não apresentou diferenças significativas na porcentagem de arsênio retido, entretanto quando uma concentração de 2% do complexante foi empregada, observou-se um leve decréscimo na quantidade de arsênio extraído. Como conseqüência destes resultados e, visando à utilização da menor quantidade possível de reagentes, adotou-se 1% como concentração de trabalho para o complexante DDTP. Por outro lado, em concordância com resultados apresentados anteriormente por da Silva e colaboradores (DA SILVA et al., 1998), empregou-se uma concentração final do surfactante Triton X-114 igual a 0,05% m/v.

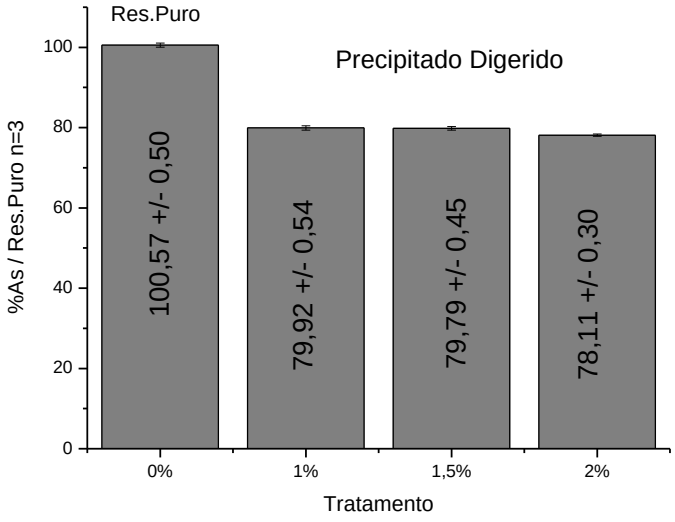


Figura 6.1 - Percentagens de arsênio extraído das soluções laboratoriais de descarte mediante extração no ponto nuvem empregando diferentes concentrações do complexante utilizado.

Como esperado, foi conseguida a complexação do arsênio presente nas soluções de descarte e sua separação dos outros elementos como sódio ou boro presentes nas mesmas.

Em torno de 80% do arsênio presente nas soluções de descarte foi recuperado na fase orgânica precipitada, aproximadamente uns 0,5 mL. Assim o volume de rejeitos líquidos, ricos em arsênio, produzidos após as pesquisas analíticas foi reduzido 80 vezes uma vez que a cada 40 mL de resíduo gerado se obteve em torno de 0,5 mL de precipitado contendo em torno de 80% do arsênio presente nos resíduos líquidos sem tratamento.

6.3.2 Extração de boro

Os precipitados de boro obtidos pelo método de mineralização hidrotérmica foram separados da fase líquida, secados e armazenados. Na Figura 6.2 se apresenta a percentagem de recuperação do boro em função do empobrecimento da fase líquida após o tratamento hidrotérmico, comparadas com o resíduo original sem nenhum tipo de tratamento.

Tabela 6.1 - Resultados da % extraída do arsênio presente nas soluções de descarte originais e nos precipitados obtidos após o tratamento pelo método de extração no ponto nuvem. (n=3)

Tratamento	Teor de Boro (cps)	% Recuperada
Branco	372,57 ± 4,53	0,03
Resíduo Tratado	$4,35e^5 \pm 7,67e^3$	65,75
Resíduo S/tratamento	$1,27e^6 \pm 9,91e^3$	100,0

Foi conseguida uma recuperação de 75% do boro presente nas soluções residuais geradas no nosso laboratório, estes resultados encontram-se distantes dos de 99% recuperados de soluções de boro artificiais relatado por Itakura e colaboradores (2005). No entanto, salienta-se que, com o intuito de evitar perdas de arsênio por evaporação, as soluções de descarte receberam um primeiro tratamento para extração do arsênio mediante a complexação com DDTP e extração no ponto nuvem com Triton X-114. Com isto, a composição das soluções foi modificada pela presença de resíduos dos reagentes aplicados na primeira etapa da descontaminação. Por tanto, a menor porcentagem de recuperação do boro aqui obtido, provavelmente se deva a interferências destes resíduos na formação dos precipitados.

Embora a remoção do boro presente nas soluções de descarte haja sido menor do que o esperado, o principal objetivo desta etapa da pesquisa, a remoção do boro e, a minimização do volume de resíduos após os experimentos analíticos foi conseguido satisfatoriamente, uma vez que por cada 30 mL de solução tratada obteve-se um precipitado ocupando um volume final inferior a 4 mL, uma redução de volume maior do que 7 vezes.

6.4 Conclusões

Majoritariamente utilizadas em química analítica como técnicas de pré-concentração para determinação de elementos traços, as técnicas de extração de arsênio no ponto nuvem e precipitação do boro com hidróxido de cálcio podem ser perfeitamente empregadas para a descontaminação das soluções de descarte

geradas durante a pesquisa, ricas nestes elementos. Aplicando estes procedimentos para a minimização dos resíduos perigosos gerados nos laboratórios, além de se cumprir com as normas internas dos diversos conselhos de ética na pós-graduação, contribui-se com a química limpa e redução de danos ocasionados ao meio ambiente.

As fases orgânicas precipitada, ricas em arsênio, derivadas da extração no ponto nuvem, assim como os precipitados sólidos de boro resultantes da mineralização hidrotérmica, podem posteriormente ser liofilizadas e armazenadas, ocupando assim um espaço muito menor do que os grandes volumes de rejeitos líquidos gerados corriqueiramente.

Por outro lado, consideráveis quantias de arsênio e boro que, normalmente seriam descartadas, agora podem ser reutilizadas, mediante a regeneração ou reconstituição dos resíduos secos para preparar soluções padrão. Com isto, além de contribuir com a minimização de efeitos adversos no meio ambiente, colabora-se com a redução de gastos desnecessários com reagentes.

REFERÊNCIAS[7]

ACKERMAN, A. H. et al. Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 39, n. 14, p. 5241-5246, 2005.

ACKLEY, K. L. et al. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 14, n. 5, p. 845-850, 1999.

ACKLEY, K. L. et al. Separation of metalloporphyrins by capillary electrophoresis with UV detection and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, [S.I.], v. 888, n. 1-2, p. 293-298, 2000.

AKTER, K. F. et al. Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV HG-AAS and LC-ICP-MS. **Talanta**, London, v. 68, n. 2, p. 406-415, 2005.

ALI, I.; JAIN, C. K. Advances in arsenic speciation techniques. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 84, n. 12, p. 947-964, 2004.

ALTRIA; D., K. **Capillary Electrophoresis Guidebook**: Principles, Operations and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1996.

ANDERSON, R. K. et al. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation.1. Reaction media. **Analyst**, London, v. 111, n. 10, p. 1143-1152, 1986.

ATAMNA, I. Z. et al. Factors that influence mobility, resolution and selectivity in capillary zone electrophoresis. 2. The role of the buffers cation. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 13, p. 2517-2527, 1990a.

ATAMNA, I. Z. et al. Factors that influence mobility, resolution, and selectivity in capillary zone electrophoresis. 3. The role of the buffers anion. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 16, p. 3201-3210, 1990b.

BELLO, M. S. Electrolytic modification of a buffer during a capillary electrophoresis run. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 744, n. 1-2, p. 81-91, 1996.

BEZERRA, M. D. et al. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 40, n. 4, p. 269-299, 2005.

BROWNER, R. F. Atomic-fluorescence spectrometry as an analytical technique - Critical review. **Analyst**, London, v. 99, n. 1183, p. 617-644, 1974.

[7] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. **Talanta**, London, v. 44, n. 9, p. 1581-1604, 1997.

CAMARA, C. Sample preparation for speciation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 381, n. 2, p. 277-278, 2005.

CAMPBELL, A. D. A critical survey of hydride generation techniques in atomic spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 227-244, 1992.

CARUSO, J. A. et al. An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples. **Analyst**, London, v. 126, n. 2, p. 136-140, 2001.

CASIOT, C. et al. Optimization of the hyphenation between capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of As-, Sb-, Se- and Te-species, applicable to soil extracts. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 173-187, 2002.

CAVA-MONTESINOS, P. et al. Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish. **Talanta**, London, v. 66, n. 4, p. 895-901, 2005.

D'ULIVO, A. et al. The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 423-438, 2005.

D'ULIVO, A. et al. Flame-in-gas-shield miniature flame hydride atomizers for ultra trace element determination by chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 48-55, 2009.

DA SILVA, M. A. M. et al. Determination of Ag and Au in geological samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 13, n. 12, p. 1369-1373, 1998.

DA SILVA, M. A. M. et al. Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 55, n. 7, p. 803-813, 2000.

DAGNAC, T. et al. Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 364, n. 1-3, p. 19-30, 1998.

DAGNAC, T. et al. Speciation of arsenic in mussels by the coupled system liquid chromatography UV irradiation hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 48, n. 4, p. 763-772, 1999.

DAY, J. A. et al. A comparison of capillary electrophoresis using indirect UV absorbance and ICP-MS detection with a self-aspirating nebulizer interface. **Analyst**, London, v. 125, n. 5, p. 819-823, 2000.

DE MORAES, M. D. L. et al. Preconcentration strategies in capillary electrophoresis (CE). Part 1. Manipulation of the analyte electrophoretic velocity. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

DEDINA, J. et al. Selenium hydride atomization, fate of free atoms and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 53, n. 13, p. 1777-1790, 1998.

DEGANI, A. L. G. et al. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 7, p. 21-25, 1998.

DEVESA, V. et al. Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 46, n. 1, p. 1-8, 2008.

DIETZ, C. et al. Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, n. 1-2, p. 114-129, 2007.

DUFAILLY, V. et al. A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 23, n. 9, p. 1263-1268, 2008.

FALLON, A. et al. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: BELL, L. D. (Ed.). **Applications of HPLC in biochemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company, 1987. cap.2. p. 338.

FANG, Q. et al. Sequential injection sample introduction microfluidic-chip based capillary electrophoresis system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 390, n. 1-3, p. 27-37, 1999.

FELDMANN, J. et al. Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 45, n. 11, p. 1988-1997, 1999.

FORTE, G. et al. Capillary electrophoresis speciation analysis of various arsenical compounds. **Microchemical Journal**, New York, v. 79, n. 1-2, p. 15-19, 2005.

GASPAR, A. et al. Separation of organic and inorganic arsenic species by capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, New York, v. 51, p. S135-S138, 2000.

GETTAR, R. T. et al. Determination of inorganic and organic anionic arsenic species in water by ion chromatography coupled to hydride generation-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 884, n. 1-2, p. 211-221, 2000.

GIL, E. P. et al. Determination of arsenic species by field amplified injection capillary electrophoresis after modification of the sample solution with methanol. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 389, n. 1-3, p. 9-19, 1999.

GOMEZ-ARIZA, J. L. et al. Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 938, n. 1-2, p. 211-224, 2001.

GOMEZ-ARIZA, J. L. et al. Evaluation of atomic fluorescence spectrometry as a sensitive detection technique for arsenic speciation. **Applied Organometallic Chemistry**, Chichester, v. 12, n. 6, p. 439-447, 1998.

GOMEZ-ARIZA, J. L. et al. A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. **Talanta**, London, v. 51, n. 2, p. 257-268, 2000a.

GOMEZ-ARIZA, J. L. et al. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. **Analyst**, London, v. 125, n. 3, p. 401-407, 2000b.

GONG, Z. L. et al. Arsenic speciation analysis. **Talanta**, London, v. 58, n. 1, p. 77-96, 2002.

GOTO, K. et al. Spectrophotometric determination of manganese with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a nonionic surfactant. **Talanta**, London, v. 24, n. 12, p. 752-753, 1977.

GRESCHONIG, H. et al. Capillary electrophoretic separation of inorganic and organic arsenic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 362, n. 2, p. 218-223, 1998.

HALL, G. E. M. et al. Stability of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) in water samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 14, n. 2, p. 205-213, 1999.

HANSEN, S. H. et al. Separation of 7 arsenic compounds by high-performance liquid-chromatography with online detection by hydrogen argon flame atomic-absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass-spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 7, n. 4, p. 629-634, 1992.

HEITKEMPER, D. T. et al. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 16, n. 4, p. 299-306, 2001.

HERCE-PAGLIAI, C. et al. Presence and distribution of arsenical species in beers. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 16, n. 6, p. 267-271, 1999.

HINDSON, B. J. et al. Development of an automated sample preparation module for environmental monitoring of biowarfare agents. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, n. 13, p. 3492-3497, 2004.

HOLAK, W. Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 41, n. 12, p. 1712, 1969.

HORSTKOTTE, B. et al. Development of a capillary electrophoresis system coupled to sequential injection analysis and evaluation by the analysis of nitrophenols. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 87, n. 12, p. 797-811, 2007.

HOWARD, A. G. (Boro)hydride techniques in trace element speciation - Invited lecture. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, n. 3, p. 267-272, 1997.

HUANG, J. H.; ILGEN, G. Blank values, adsorption, pre-concentration, and sample preservation for arsenic speciation of environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 512, n. 1, p. 1-10, 2004.

HUNG, D. Q. et al. Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review. **Talanta**, London, v. 64, n. 2, p. 269-277, 2004.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 9, p. 876-886, 2006.

ISSAQ, H. J. et al. Factors that influence mobility, resolution, and selectivity in capillary zone electrophoresis. 1. Sodium-phosphate vs potassium phosphate. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 7, p. 1247-1259, 1990.

ITAKURA, T. et al. Precipitation recovery of boron from wastewater by hydrothermal mineralization. **Water Research**, New York, v. 39, n. 12, p. 2543-2548, 2005.

JAAFAR, J. et al. Online preconcentration of arsenic compounds by dynamic pH junction-capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, New York, v. 30, n. 3, p. 391-398, 2007.

JAAFAR, J. et al. Field enhanced sample injection for the CE determination of arsenic compounds using successive multiple ionic polymer layer coated capillaries. **Chromatographia**, New York, v. 69, n. 11-12, p. 1437-1441, 2009.

JENKINS, R. O. et al. Bacterial degradation of arsenobetaine via dimethylarsinoylacetate. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 180, n. 2, p. 142-150, 2003.

KAISE, T. et al. Biotransformation of arsenobetaine to trimethylarsine oxide by marine microorganisms in a gill of clam Meretrix lusoria. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 443-449, 1998.

KARTHIKEYAN, S.; HIRATA, S. Arsenic speciation in environmental samples. **Analytical Letters**, New York, v. 36, n. 11, p. 2355-2366, 2003.

KINZER, J. A. et al. Effect of laminar flow in capillary electrophoresis: Model and experimental results on controlling analysis time and resolution with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, n. 18, p. 3250-3257, 1996.

KIRLEW, P. W. et al. An evaluation of ultrasonic nebulizers as interfaces for capillary electrophoresis of inorganic anions and cations with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 221-237, 1998.

KITAGAWA, F. et al. Analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis using indirect UV and mass spectrometric detections. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 27, n. 11, p. 2233-2239, 2006.

KOELLENSPERGER, G. et al. CE-ICP-SFMS and HPIC-ICP-SFMS for arsenic speciation in soil solution and soil water extracts. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 17, n. 9, p. 1042-1047, 2002.

KOSHCHEEVA, O. S. et al. Arsenic speciation in natural and contaminated waters using CZE with in situ derivatization by molybdate and direct UV-detection. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 30, n. 6, p. 1088-1093, 2009.

KUBAN, P. et al. Flow injection analysis capillary electrophoresis system with hydrodynamic injection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 378, n. 1-3, p. 55-62, 1999.

KULKA, S. et al. Automated sample preparation and analysis using a sequential-injection-capillary electrophoresis (SI-CE) interface. **Analyst**, London, v. 131, n. 6, p. 739-744, 2006.

KUMAR, A. R.; RIYAZUDDIN, P. Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 21, n. 12, p. 1401-1410, 2005.

LABORDA, F. et al. Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over? **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 797-802, 2002.

LAMBLE, K. J.; HILL, S. J. Arsenic speciation in biological samples by on-line high performance liquid chromatography microwave digestion hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 334, n. 3, p. 261-270, 1996.

LARSEN, E. H. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 253-265, 1998.

LAVORANTE, A. F. et al. An alternative sample introduction device for a home-made capillary electrophoresis system. **Analytical Letters**, New York, v. 37, n. 12, p. 2501-2513, 2004.

LE, X. C. et al. Arsenic speciation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, n. 1, p. 26A-33A, 2004.

LI, G. et al. Chemical vapor generation by reaction of cadmium with potassium tetrahydroborate and sodium iodate in acidic aqueous solution for atomic fluorescence spectrometric application. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 19, n. 8, p. 1010-1013, 2004.

LI, K.; LI, S. F. Y. Speciation of selenium and arsenic compounds in natural-waters by capillary zone electrophoresis after on-column preconcentration with field-amplified injection. **Analyst**, London, v. 120, n. 2, p. 361-366, 1995.

LINDEMANN, T. et al. Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 368, n. 2-3, p. 214-220, 2000.

LIU, Y. et al. Capillary electrophoresis coupled online with inductively-coupled plasma-mass spectrometry for elemental speciation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, n. 13, p. 2020-2025, 1995.

LOPEZ, M. A. et al. Determination of 6 arsenic species by high-performance liquid-chromatography hydride generation atomic-absorption spectrometry with online thermooxidation. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 346, n. 6-9, p. 643-647, 1993.

LU, Q. H.; BARNES, R. M. Evaluation of an ultrasonic nebulizer interface for capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 54, n. 2, p. 129-143, 1996.

LU, Q. H. et al. Capillary electrophoresis with inductively-coupled plasma-mass spectrometry - Interface evaluation. In: MEETING OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 208., 1994, Washington. **Abstracts of papers**. Washington: ACS, 1994. p. 151.

LU, Q. H. et al. Interface for capillary electrophoresis and inductively-coupled plasma-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, p. 2949-2956, 1995.

MACKA, M. et al. Changes in electrolyte pH due to electrolysis during capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 70, n. 4, p. 743-749, 1998.

MAGNUSON, M. L. et al. Speciation of arsenic compounds in drinking water by capillary electrophoresis with hydrodynamically modified electroosmotic flow detected through hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry with a membrane gas-liquid separator. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, n. 7, p. 689-695, 1997a.

MAGNUSON, M. L. et al. Speciation of selenium and arsenic compounds by capillary electrophoresis with hydrodynamically modified electroosmotic flow and on-line reduction of selenium(VI) to selenium(IV) with hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Analyst**, London, v. 122, n. 10, p. 1057-1061, 1997b.

MAJIDI, V.; MILLER-IHLI, N. J. Potential sources of error in capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry for chemical speciation. **Analyst**, London, v. 123, n. 5, p. 809-813, 1998a.

MAJIDI, V.; MILLER-IHLI, N. J. Two simple interface designs for capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analyst**, London, v. 123, n. 5, p. 803-808, 1998b.

MCSHEEHY, S. et al. Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS). **Analyst**, London, v. 126, n. 7, p. 1055-1062, 2001.

MEERMANN, B. et al. Capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometric and electrospray time of flight mass spectrometric detection for the determination of arsenic species in fish samples. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 29, n. 12, p. 2731-2737, 2008.

MEI, E. et al. Interface for coupling capillary electrophoresis to inductively coupled plasma and on-column concentration technique. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, n. 11, p. 2187-2192, 1997.

MESTER, Z.; FODOR, P. Analytical system for arsenobetaine and arsenocholine speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, n. 3, p. 363-367, 1997.

MICHALKE, B.; SCHRAMEL, P. Capillary electrophoresis interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry for element selective detection in arsenic speciation. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 19, n. 12, p. 2220-2225, 1998.

MILSTEIN, L. S. et al. Sample preparation, extraction efficiency, and determination of six arsenic species present in food composites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 15, p. 4180-4184, 2003.

MORIN, P. et al. Separation of arsenic anions by capillary zone electrophoresis with uv detection. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 342, n. 4-5, p. 357-362, 1992.

NADKARNI, R. A. Applications of hydride generation atomic-absorption spectrometry to coal analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 363-368, 1982.

NAIDU, R. et al. Application of capillary electrophoresis to anion speciation in soil water extracts: II. Arsenic. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, n. 1, p. 122-128, 2000.

NAM, S. H. et al. A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC–ICP-MS. **Microchemical Journal**, New York, v. 95, n. 1, p. 20-24, 2010.

NAM, S. H. et al. Preliminary results of extraction, separation and quantitation of arsenic species in food and dietary supplements by HPLC-ICP-MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 27, n. 6, p. 903-908, 2006.

NARUKAWA, T. et al. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, London, v. 77, n. 1, p. 427-432, 2008.

NEFF, J. M. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 16, n. 5, p. 917-927, 1997.

NEWCOMBE, C. et al. Accumulation or production of arsenobetaine in humans? **Journal of Environmental Monitoring**, London, 2010. DOI: 10.1039/b921588c.

NOBREGA, J. A. et al. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 1855-1876, 2002.

OLESIK, J. W.; FISTER, J. C. Incompletely desolvated droplets in argon inductively coupled plasmas - Their number, original size and effect on emission intensities. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 46, n. 6-7, p. 851-868, 1991.

OLESIK, J. W.; HOBBS, S. E. Monodisperse dried microparticulate injector - A new tool for studying fundamental processes in inductively-coupled plasmas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 20, p. 3371-3378, 1994.

OLESIK, J. W. et al. Capillary electrophoresis inductively-coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, n. 1, p. 1-12, 1995.

PARDO-MARTINEZ, M. et al. Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 441, n. 1, p. 29-36, 2001.

PENGPRECHA, P. et al. Biodegradation of arsenosugars in marine sediment. **Applied Organometallic Chemistry**, Chichester, v. 19, n. 7, p. 819-826, 2005.

PERGANTIS, S. A. et al. Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 44, n. 11, p. 1941-1947, 1997.

PHILLIPS, D. J. H. Arsenic in aquatic organisms - A review, emphasizing chemical speciation. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 151-186, 1990.

PIZARRO, I. et al. Arsenic speciation in environmental and biological samples - Extraction and stability studies. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 495, n. 1-2, p. 85-98, 2003a.

PIZARRO, I. et al. Evaluation of stability of arsenic species in rice. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 376, n. 1, p. 102-109, 2003b.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4150-4168, 1999.

RAAB, A. et al. Arsenic accumulation and speciation analysis in wool from sheep exposed to arsenosugars. **Talanta**, London, v. 58, n. 1, p. 67-76, 2002.

RASMUSSEN, H. T.; MCNAIR, H. M. Influence of buffer concentration, capillary internal diameter and forced-convection on resolution in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 516, n. 1, p. 223-231, 1990.

RATTANACHONGKIAT, S. et al. Determination of arsenic species in fish, crustacean and sediment samples from Thailand using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Journal of Environmental Monitoring**, London, v. 6, n. 4, p. 254-261, 2004.

REGMI, R. et al. Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, n. 4, p. 775-782, 2007.

REYES, L. H. et al. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 78, n. 3, p. 983-990, 2009.

RICHARDSON, D. D. et al. Hydride generation interface for speciation analysis coupling capillary electrophoresis to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, n. 23, p. 7137-7142, 2004.

ROSAL, C. G. et al. Roxarsone and transformation products in chicken manure: Determination by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 26, n. 7-8, p. 1606-1614, 2005.

SANCHEZ-RODAS, D. et al. Determination of an arsenosugar in oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Analyst**, London, v. 127, n. 1, p. 60-65, 2002.

SANTOS, H. M.; CAPELO, J. L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, London, v. 73, p. 795-802, 2007.

SANZ, E. et al. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 535, n. 1-2, p. 227-235, 2005.

SANZ, E. et al. Alternative extraction methods for arsenic speciation in hair using ultrasound probe sonication and pressurised liquid extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 22, n. 2, p. 131-139, 2007.

S SCHLEGEL, D. et al. Speciation of arsenic and selenium-compounds by ion chromatography with inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry detection using the hydride technique. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 683, n. 1, p. 261-267, 1994.

SCHMEISSER, E. et al. Volatile analytes formed from arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and implications for arsenic speciation analyses. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, n. 2, p. 418-423, 2004.

SCHWEDT, G.; RIECKHOFF, M. Separation of thio- and oxothioarsenates by capillary zone electrophoresis and ion chromatography. Journal of **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 736, n. 1-2, p. 341-350, 1996.

SILVA, M. F. et al. Coupling cloud point extraction to instrumental detection systems for metal analysis. **Microchimica Acta**, Wien, v. 155, n. 3-4, p. 349-364, 2006.

SLEJKOVEC, Z. et al. Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-(UV)-HG-AFS. **Talanta**, London, v. 49, n. 3, p. 619-627, 1999.

SLEJKOVEC, Z. et al. Underestimation of the total arsenic concentration by hydride generation techniques as a consequence of the incomplete mineralization of arsenobetaine in acid digestion procedures. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 443, n. 2, p. 277-282, 2001.

SÖROS, C. et al. The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 377, n. 1, p. 25-31, 2003.

STOYANOV, A. V.; PAWLISZYN, J. Buffer composition changes in background electrolyte during electrophoretic run in capillary zone electrophoresis. **Analyst**, London, v. 129, n. 10, p. 979-982, 2004.

SUÁREZ, C. A.; GINÉ, M. F. A reactor/phase separator coupling capillary electrophoresis to hydride generation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (CE-HG-ICP OES) for arsenic speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 20, n. 12, p. 1395-1397, 2005.

SUN, B. G. et al. Separation of organic and inorganic arsenic species by capillary electrophoresis using direct spectrophotometric detection. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 23, n. 15, p. 2430-2438, 2002.

SUN, B. G. et al. Trace determination of arsenic species by capillary electrophoresis with direct UV detection using sensitivity enhancement by counter- or co-electroosmotic flow stacking and a high-sensitivity cell. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 24, n. 12-13, p. 2045-2053, 2003.

SUN, B. G. et al. Speciation of arsenic and selenium by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1039, n. 1-2, p. 201-208, 2004.

SUN, H. W. et al. Determination of zinc in food using atomic fluorescence spectrometry by hydride generation from organized media. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 457, n. 2, p. 305-310, 2002.

SZPUNAR, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. **Analyst**, London, v. 125, n. 5, p. 963-988, 2000.

TAVÁRES, M. F. M. Capillary electrophoresis: Basic concepts. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVÁRES, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Química Nova**, São Paulo, 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TERLECKA, E. Arsenic speciation analysis in water samples: A review of the hyphenated techniques. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 107, n. 1-3, p. 259-284, 2005.

THOMAS, P.; SNIATECKI, K. Inductively-coupled plasma-mass spectrometry - Application to the determination of arsenic species. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 351, n. 4-5, p. 410-414, 1995.

TRIPATHI, R. M. et al. Arsenic intake by the adult population in Bombay City. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 208, n. 1-2, p. 89-95, 1997.

TSALEV, D. L. et al. Speciation determination of arsenic in urine by high-performance liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line ultraviolet photooxidation. **Analyst**, London, v. 123, n. 8, p. 1703-1710, 1998.

VALE, G. et al. Ultrasonic-assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental speciation: A tutorial. **Talanta**, London, v. 75, n. 4, p. 872-884, 2008.

VAN DEN BROECK, K.; VANDECASTEELE, C. Capillary electrophoresis for the speciation of arsenic. **Microchimica Acta**, Wien, v. 128, n. 1-2, p. 79-85, 1998.

VAN HOLDERBEKE, M. et al. Speciation of six arsenic compounds using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 14, n. 2, p. 229-234, 1999.

VAN HULLE, M. et al. Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. **Analyst**, London, v. 127, n. 5, p. 634-640, 2002.

WAHLEN, R. et al. Arsenic speciation in marine certified reference materials - Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 19, n. 7, p. 876-882, 2004.

WATANABE, H.; TANAKA, H. Nonionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid - extraction of zinc(ii) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, London, v. 25, n. 10, p. 585-589, 1978.

WINEFORDNER, J. D. Principles, methodologies, and applications of atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 55, n. 2, p. 72-78, 1978.

WINEFORDNER, J. D.; STAAB, R. A. Determination of zinc cadmium + mercury by atomic fluorescence flame spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 1, p. 165, 1964.

WINEFORDNER, J. D.; VICKERS, T. J. Atomic fluorescence spectrometry as means of chemical analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 1, p. 161, 1964.

WROBEL, K.; CARUSO, J. A. Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 381, n. 2, p. 317-331, 2005.

WU, C. H. et al. Microsequential injection: anion separations using 'Lab-on-Valve' coupled with capillary electrophoresis. **Analyst**, London, v. 127, n. 7, p. 898-905, 2002.

WU, J. Z.; HO, P. C. Speciation of inorganic and methylated arsenic compounds by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection - Application to the analysis of alkali extracts of As2S2 (realgar) and As2S3 (orpiment). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1026, n. 1-2, p. 261-270, 2004.

WUILLOUD, R. G. et al. Investigation of arsenic speciation in algae of the Antarctic region by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-Ion Trap MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 21, n. 11, p. 1214-1223, 2006.

YANG, G. D. et al. Speciation analysis of arsenic in Mya arenaria Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 78, n. 2, p. 471-476, 2009a.

YANG, G. D. et al. Speciation analysis of arsenic in sea foods with capillary electrophoresis-ultraviolet detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Beijing, v. 37, n. 4, p. 532-536, 2009.

YEH, C. F.; JIANG, S. J. Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 26, n. 7-8, p. 1615-1621, 2005.

YIN, X. B. et al. On-line coupling of capillary electrophoresis to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for arsenic speciation analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 15, p. 3720-3725, 2002.

YUAN, C. G. et al. Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, Oryza sativa L., and analysis by HPLC-HG-AFS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 20, n. 2, p. 103-110, 2005.

ZHANG, P. D. et al. Determination of arsenic species by capillary zone electrophoresis with large-volume field-amplified stacking injection. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 22, n. 16, p. 3567-3572, 2001.

ZHANG, P. D. et al. Capillary electrophoretic analysis of arsenic species with indirect laser induced fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, New York, v. 25, n. 3, p. 155-159, 2002.

ZHANG, X. et al. Arsenic speciation in serum of uraemic patients based on liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry and on-line UV photo-oxidation digestion. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 319, n. 1-2, p. 177-185, 1996.

ZHANG, X. R. et al. Speciation of toxicologically important arsenic species in human serum by liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 11, n. 11, p. 1075-1079, 1996.

ZHU, T. et al. Variation of the ph of the background electrolyte as a result of electrolysis in capillary electrophoresis. **Hrc - Journal of High Resolution Chromatography**, Heidelberg, v. 17, n. 7, p. 563-564, 1994.