



Roberta Amorim de Assis

**Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para
análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar
com detector de ICPMS**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadores: Prof. Dr. Norbert Miekeley
Prof. Dr. Ivo Lewin Küchler

Rio de Janeiro, dezembro de 2006



Roberta Amorim de Assis

**Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para
análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar
com detector de ICPMS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em
Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão
Examinadora abaixo assinada.

Prof. Dr. Norbert Miekeley

Orientador
PUC-Rio

Prof. Dr. Ivo Lewin Küchler

UFF

Profa. Dra. Cora Cunha Campos

UFRJ

Dra. Shirley de Mello P. Abrantes

FIOCRUZ

Prof. Dr. Ricardo Erthal Santelli

UFF

Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos

PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador(a) Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2006

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Roberta Amorim de Assis

Graduou-se em Química Industrial pela Universidade Federal Fluminense, fazendo parte do quadro permanente de professores desta universidade desde 1990. Obteve seu título de Msc em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Ficha Catalográfica

Assis, Roberta Amorim de

Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS / Roberta Amorim de Assis ; orientador: Norbert Miekeley ; co-orientador: Ivo Lewin Küchler . – 2006.

159 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. ICPMS. 3. Eletroforese capilar. 4. Especiação de arsênio. 5. Contaminantes em suco de uva. 6. Metabolismo de MMA (V) em cavalos. I. Miekeley, Norbert. II. Küchler, Ivo Lewin. III Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Ao Clauber e aos meus filhos, Michele e Vítor, pelo incentivo, apoio e compreensão.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Norbert Miekeley e Ivo L. Küchler, pela orientação, confiança e apoio na realização deste trabalho.

À PUC-Rio pela bolsa recebida da VRAC.

Aos funcionários da PUC-Rio, em especial Adriana, Rodrigo, Anselmo e Noberto pela ajuda quando necessário.

Ao técnico Álvaro Jorge Pereira pelos ensinamentos sobre ICPMS, ajuda nas análises e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de ICPMS da PUC-Rio, Paulo e Leonardo, pela ajuda nas análises.

Ao Dr. Joerg Feldman da Universidade de Aberdeen pela gentileza da doação dos padrões de As e Sb.

Aos colegas da PUC-Rio pelo apoio e incentivo.

Ao CENPES/Petrobrás pelo apoio financeiro e pelo empréstimo de um ICPMS, modelo Elan 6000.

À Burgener Research, AU pela doação do nebulizador Mira Mist CE.

Às minhas amigas Heloísa e Ana pelo apoio, incentivo e, principalmente, pela amizade que me fortaleceram nos momentos mais difíceis.

À UFF pela concessão do meu afastamento total.

Aos colegas do Departamento de Química Analítica, em especial minhas amigas Aída e Soly, pelo incentivo, apoio e pela amizade sempre presentes.

À Dra. Shirley de Mello P. Abrantes, do INCQS da FIOCRUZ, pela ajuda inicial

no aprendizado sobre eletroforese capilar.

À diretora do Laboratório Antidoping do Jockey Clube do Brasil, Marta Brandão Tozzi e seus colaboradores, pela importante cooperação no projeto sobre o metabolismo de MMA(V) em cavalos.

À minha mãe Lenira, meus irmãos Lúcia e Roberto, pelo carinho, incentivo e apoio emocional.

Aos integrantes da Comissão Examinadora.

Resumo

Assis, Roberta Amorim, Miekeley, Norbert (orientador). **Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS.** Rio de Janeiro, 2006. 159p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A eletroforese capilar (CE) como técnica de separação está bem estabelecida para o uso em estudos de especiação elementar; porém, em muitas aplicações, a baixa sensibilidade devido à detecção UV, impede a obtenção de baixos limites de detecção (LD). Desta forma, tem sido de grande relevância o estudo do acoplamento (hifenação) entre a CE e sistemas de detecção mais sensíveis. Iniciou-se o trabalho com uma avaliação crítica entre diversas interfaces para o acoplamento entre a CE e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS). Foram testadas uma interface comercial e outras, adaptadas no próprio laboratório a partir de diferentes micronebulizadores e câmaras de nebulização. O estudo concluiu que o nebulizador de fluxo paralelo (Mira Mist CE, Burgener Research, AU) apresentou melhor performance, devido a ausência de efeito de retro-pressão acima do orifício do capilar de eletroforese, e por ter um canal de amostra suficientemente grande para introduzir o capilar até a saída do nebulizador, impedindo assim, o entupimento do mesmo em trabalhos de rotina, observado em todos os outros nebulizadores. Utilizando este nebulizador e uma câmara ciclônica de volume reduzido (20 mL), foi desenvolvida uma metodologia para separação eletroforética e quantificação por ICPMS de cinco espécies de arsênio: AsIII, AsV, MMAV, DMAV e AsB. Um estudo sistemático de diversos parâmetros experimentais resultou nas seguintes condições otimizadas para a separação e nebulização: tampão de fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH = 9) com 1,5 mmol L⁻¹ de TTAB como modificador do fluxo eletroosmótico; tempo de injeção no modo hidrodinâmico de 40 s a 50 mbar; e solução make up de NH₄NO₃ 20 mmol L⁻¹ (pH = 9) com 10 % de metanol, e vazão de 40 µL min⁻¹. Iodeto foi utilizado para monitorar a separação eletroforética, enquanto que Cs⁺ foi usado para controlar a eficiência e constância de nebulização. Os desvios padrão relativos para a posição dos picos e as suas

áreas correspondentes foram $< 10\%$ para todas as espécies, enquanto que os limites de detecção foram de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AsB e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para as demais. A metodologia foi aplicada para análise de especiação de arsênio em amostras de suco de uva, e num estudo preliminar sobre o metabolismo de Arsenil® (MMAV) em cavalos. No primeiro estudo, observou-se que as concentrações de As-total em todas as amostras analisadas (31 de 20 marcas de suco de uva diferentes), e também de outros elementos tóxicos (p.ex. Al, Hg, Cd, Sn, Pb, e Al), encontravam-se abaixo dos “Limites Máximos de Tolerância” estabelecidos pela legislação brasileira. Estudos de especiação por CE-ICPMS e FIA-HG-ICPMS mostravam que entre os cinco espécies de arsênio estudadas, apenas as inorgânicas (AsV e AsIII) estavam presentes, em proporções variáveis. O estudo sobre a absorção e excreção da droga Arsenil® (MMAV) em cavalos mostrou que a droga é rapidamente eliminada pelo organismo, sugerindo uma cinética de primeira ordem para o processo, durante o tempo investigado (sete dias), com tempos de meia vida de aproximadamente 34 h (urina) e 44 h (plasma), respectivamente. Observou-se a presença de DMAV na urina como único metabólito da droga, já presente nos primeiros dois dias da aplicação, e acompanhando o perfil de absorção e excreção do Arsenil® (MMAV). Estes resultados indicam que a metilação é a via principal de desintoxicação, confirmando observações já feitas por diversos autores, mas em outros sistemas biológicos.

Palavras-chave

ICPMS; eletroforese capilar; especiação de arsênio; contaminantes em suco de uva; metabolismo de MMAV em cavalos.

Abstract

Assis, Roberta Amorim, Miekeley, Norbert (orientador). **Improvements and applications of a methodology for the speciation analysis of arsenic using capillary electrophoresis with ICPMS detector.** Rio de Janeiro, 2006. 159p. Doctoral Thesis, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.

Capillary electrophoresis (CE) is a well established separation technique for the study of elemental speciation, however, its low electroosmotic flow (nL min^{-1}) restricts its application in many studies in which low detection limits are required. For this reason, the study of CE coupling (hyphenation) to more sensitive detectors is of great relevance. This work was initiated with a critical evaluation of different interfaces of CE to ICPMS, including a commercial interface, and others, mounted in our laboratory from different micronebulizers and spray chambers. Best results in routine work were obtained with a parallel flow nebulizer (Mira Mist CE, Burgener Research, AU) due to the absence of back-pressure on the capillary orifice and its large internal sample channel, which permits that the CE capillary can be inserted up to the nebulizer exit, thus avoiding clogging problems observed in all other nebulizers. Using this nebulizer in combination with a small-volume cyclonic spray chamber (20 mL), a method was developed for the electrophoretic separation and quantification by ICPMS of five arsenic species: AsIII, AsV, MMAV, DMAV and AsB. The systematic study of different experimental parameters resulted in the following optimized separation and nebulization conditions: phosphate buffer ($\text{pH} = 9.0$), 20 mmol L^{-1} with 1.5 mmol L^{-1} TTAB as electroosmotic flow modifier; injection time (hydrodynamic mode) of 40 s at 50 mbar; make-up solution of NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} ($\text{pH} = 9$) containing 10% of methanol and injected at flow of $40 \mu\text{L min}^{-1}$. Iodide was used as a monitor for the electrophoretic separation, whereas Cs^+ was applied for controlling the nebulization efficiency and constancy. Repeatabilities (RSD) in peak location and peak area measurements were better than 10% in all cases, and detection limits were about $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for AsB and $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for all other species studied. The methodology was applied in the speciation analysis of arsenic in grape juice samples, and in a preliminary study on the uptake, transformation and excretion of Arsenil® (MMA^{V}) by horses. In the first study, low concentrations of total arsenic and other toxic elements (e.g Al, Hg, Cd, Sn,

Pb, e Al) were measured in 31 samples (20 different brands) and which were in accordance with “Maximum Tolerance Levels” established by Brazilian laws. Speciation analysis of these samples by CE-ICPMS and FIA-HG-ICPMS revealed the existence, in varying proportions, of only inorganic arsenic species (As^{V} and As^{III}). The investigations on the uptake and excretion of Arsenil® (MMA^{V}) by horses showed that the drug is rapidly eliminated from the organism, suggesting a first order kinetics for the excretion/elimination with half lives of about 34 h and 44 h for urine and plasma, respectively, within the time period of seven days here studied. DMA^{V} was the only metabolic alteration product of Arsenil® detected already in the first two days after drug uptake and accompanying its absorption and excretion profile. These results indicate that methylation is the principal detoxification pathway, as already observed by other authors but for different biologic systems.

Key-words: ICPMS; capillary electrophoresis; arsenic speciation; contaminants in grape juice; metabolism of MMA^{V} in horses.

Sumário

1 Introdução e objetivos	23
1.1. Importância da especiação	23
1.2. Alguns aspectos do acoplamento entre eletroforese capilar e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado	25
1.3. Objetivos deste trabalho	26
2 Teoria Geral sobre Eletroforese Capilar	28
2.1. Breve resumo sobre a técnica de eletroforese capilar	28
2.1.1. Eletroforese capilar de zona (CZE)	28
2.1.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)	29
2.1.3. Isotacoforese Capilar (CITP)	30
2.1.4. Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)	31
2.1.5. Eletroforese Capilar em Gel (CGE)	32
2.1.6. Eletrocromatografia Capilar (CEC)	33
2.2. Aspectos teóricos sobre a eletroforese capilar de zona	34
3 Revisão bibliográfica sobre o acoplamento entre eletroforese capilar e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS)	39
4 Arsênio: Breve resumo sobre a especiação deste elemento e de suas propriedades toxicológicas	50
4.1. Fontes de arsênio	50
4.2. Toxicologia do arsênio nos seres humanos	52
4.3. Toxicologia do arsênio nos animais	54
4.3.1. Determinação de arsênio como exame <i>antidoping</i> em cavalos de corrida	55
4.4. Espécies de arsênio no ambiente e estabilidade das soluções	57
4.5. Análise de especiação de arsênio	59
5 Materiais e Métodos	62

5.1. Eletroforese capilar	62
5.1.1. Condicionamento dos capilares	63
5.2. Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS)	65
5.3. Interfaces utilizadas entre CE e ICPMS	68
5.4. Preparo de reagentes e padrões	69
5.5. Coleta e preparo das amostras	71
5.5.1. Urina, sangue, plasma e pêlo	71
5.5.2. Suco de uva	73
5.6. Análise por geração de hidretos	74
6 Resultados e discussões	76
6.1. Comparação crítica das interfaces CE-ICPMS	76
6.1.1. Interface CEI-100	77
6.1.2. O nebulizador MCN-100	84
6.1.3. Nebulizador <i>MicroMist</i>	87
6.1.4. Nebulizador “Mira Mist CE”	91
6.2. Otimização e validação da metodologia para a especiação de arsênio	96
6.2.1. Otimização do pH do tampão de separação	96
6.2.2. Otimização da concentração do tampão de separação	100
6.2.3. Otimização da concentração do tensoativo TTAB	102
6.2.4. Otimização da voltagem	105
6.2.5. Parâmetros relacionados à introdução da amostra no ICPMS	108
6.3. Validação de metodologias analíticas	111
6.3.1. Separação e quantificação de espécies de arsênio por CE-ICPMS	111
6.3.2. Quantificação de arsênio por FIA-HG-ICPMS	115
6.3.3. Quantificação de As e outros elementos por ICPMS com calibração externa	118
6.4. Aplicações	121
6.4.1. Análise da amostras de suco de uva	121
6.4.1.1. Concentração de As-total e de alguns outros elementos	121

6.4.1.2. Especificação de arsênio em amostras de suco de uva	124
6.4.2. Análise do sangue, plasma, urina e pelo de crina em cavalos tratados com MMA (Arsenil®)	130
6.4.2.1. Concentração total de arsênio e de alguns outros elementos em amostras de crina de cavalo	130
6.4.2.2. Concentração de arsênio total em amostras de sangue, plasma e urina de cavalo antes, durante e depois do tratamento com Arsenil®	135
6.4.2.3. Análise de especificação de arsênio em amostras de urina	141
7 Conclusões e considerações finais	147
8 Referências bibliográficas	150

SIGLAS

AFS – Espectrometria de fluorescência atômica

As(III) – Arsenito

As(V) – Arsenato

AsB – Arsenobetaina

AsC – Arsenocolina

AAS – Espectrometria de absorção atômica

CZE – Eletroforese capilar de zona

CEC – Eletrocromatografia capilar

CGE – Eletroforese capilar em gel

CIEF – Focalização isoeletrica capilar

CITP – Isotacoforese capilar

DMA(III) – Ácido dimetil arsenoso

DMA(V) – Ácido dimetil arsínico

FEI – Federação equestre internacional

FIA – Análise por injeção em fluxo

FSC – Cromatografia de fluido supercrítico

GC – Cromatografia gasosa

HG – Geração de hidretos

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ICPOES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente
acoplado

ICPMS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

MEKC – Cromatografia eletrocinética micelar

MMA(III) – Ácido monometil arsenoso

MMA(V) – Ácido monometil arsínico

μ_{ef} – Mobilidade eletroforética

μ_{feo} – Mobilidade eletroosmótica

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho

TTAB – Brometo de tetradeciltrimetil amônio

Lista de figuras

Figura 1: Princípio da eletroforese de zona em solução livre. (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial. Adaptado de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)	29
Figura 2: Representação esquemática do princípio da cromatografia eletrocinética micelar. Adaptada de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)	30
Figura 3: Princípio da isotacoforese (a) Estado inicial, (b) Estado intermediário, (c) Estado em equilíbrio. Adaptado de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)	31
Figura 4: Princípio da focalização isoeletrica. a) geração do gradiente de pH, b) introdução da amostra, c) estado estacionário. Adaptado da referência: Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993	32
Figura 5: Princípio da Eletroforese Capilar em Gel. Adaptado da referência: Baker, 1995	32
Figura 6: Esquema de um sistema de eletroforese capilar (http://www.ceandcec.com)	34
Figura 7: Representação esquemática da parede do capilar. ϕ_{eo} = fluxo eletroosmótico (http://www.ceandcec.com)	35
Figura 8: Representação esquemática da migração de cátions e ânions na presença do fluxo eletroosmótico. μ_{ep} é a mobilidade eletroforética, EOF = fluxo eletroosmótico. (http://www.ceandcec.com)	36
Figura 9: Equipamento para eletroforese capilar utilizado neste trabalho.	62
Figura 10: Cassetes e capilares para acoplamento com ICPMS (a) e para detecção UV (b).	64
Figura 11: ICPMS Elan 6000 no Laboratório de Espectrometria de Massas da PUC-Rio.	65
Figura 12: Interface CEI-100 (Cetac Technology, EUA). (1) conector “em cruz” mostrando as entradas: (2) do capilar (CAP), (3) do contato elétrico (CON) e (4) do tubo para conduzir o líquido <i>make up</i> (MU). (5) nebulizador micro-concêntrico (MCN) inserido na câmara de nebulização (6).	77
Figura 13: Variação da Taxa de aspiração em função da vazão do gás de nebulização. Solução de In $10 \mu\text{g L}^{-1}$. a) $1,0 \text{ L min}^{-1}$, b) $1,1 \text{ L min}^{-1}$,	

- c) 1,2 L min⁻¹, d) 1,2 L min⁻¹, e) 0,9 L min⁻¹, f) 1,05 L min⁻¹. 79
- Figura 14: Medição da estabilidade do sinal de In 10 µg L⁻¹. Ar = 1,05 L min⁻¹. 79
- Figura 15: Eletroferograma de uma solução de Rb 200 µg L⁻¹. V = 30 kV.
I = 50 mbar/60s. Tampão: Borato 20 mmol L⁻¹, pH = 9,3. *Make up*: Borato
10 mmol L⁻¹, pH = 9,3. 80
- Figura 16: Separação de Cs e Li por eletroforese capilar e ICPMS. Tampão:
Borato 20 mmol L⁻¹, pH = 9,3. V = - 30 kV. I = 50 mbar/60 s. 81
- Figura 17: Eletroferograma de Sb(III) 100 µg L⁻¹. I = 50 mbar/180s. V = - 30
kV. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 6,5.
Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH = 6,5. 82
- Figura 18: Eletroferograma de Sb(V) 100 µg L⁻¹. I = 50 mbar/180s. V = - 30
kV. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 6,5.
Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH = 6,5. 82
- Figura 19: Separação de Sb(III) e Sb(V) 100 µg L⁻¹ cada. I = 50 mbar/5 s.
V = - 30 KV. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 6,5.
Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH = 6,5. 82
- Figura 20: Separação de Sb(III) 50 µg L⁻¹, Sb(V) e TMSb 10 µg L⁻¹ cada.
I = 50 mbar/5 s. V = - 30 KV. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5
mmol L⁻¹, pH = 6,5. *Make up*: Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH = 6,5. 83
- Figura 21: Sinal de Sb(V) 10 mg L⁻¹. Vazão do gás de nebulização de 0,4 L.
min⁻¹. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9.
Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + In 10 µg L⁻¹, pH = 9. I = 50 mbar/60 s.
V = - 30 kV. 84
- Figura 22: Sinal de Sb(V) 10 mg L⁻¹. Vazão do gás de nebulização de 0,5 L.
min⁻¹. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9.
Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + In 10 µg L⁻¹, pH = 9. I = 50 mbar/60 s.
V = - 30 kV. 85
- Figura 23: Sinal de Sb(V). Vazão do gás de nebulização de 0,6 L min⁻¹.
Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*:
Fosfato 10 mmol L⁻¹ + In 10 µg L⁻¹, pH = 9. I = 50 mbar/60 s. V = - 30 kV. 85
- Figura 24: Sinal de Sb(V). Vazão do gás de nebulização de 0,7 L min⁻¹.
Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*:
Fosfato 10 mmol L⁻¹ + In 10 µg L⁻¹, pH = 9. I = 50 mbar/60 s. V = - 30 kV. 85

- Figura 25: Interface composta de uma peça em formado de “cruz” acoplado ao nebulizador *MicroMist*. 87
- Figura 26: Separação de Sb(V) e As(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ cada. $I = 50 \text{ mbar/30 s}$.
 $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.
Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,5 \mu\text{g/L}$, $\text{pH} = 9$. 88
- Figura 27: Eletroferograma do MMA $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$,
 $V = -14 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.
Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. 89
- Figura 28: Eletroferograma do DMA $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$.
 $V = -14 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.
Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. 89
- Figura 29: Eletroferograma do As(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$.
 $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$.
Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ In, $\text{pH} = 9$. 89
- Figura 30: Apresentação esquemática da construção e funcionamento do nebulizador Mira Mist CE com conector “T” para eletroforese capilar. $F = \text{flow spoiler}$. Esquema adaptado do folheto de informação da Burgener Research (Au). 91
- Figura 31: Foto apresentando o acoplamento CE-ICPMS usando como interface o nebulizador *Mira Mist CE*. No detalhe (a) mostra-se o sistema nebulizador/câmara de nebulização com o “T” e a conexão elétrica e no (b) a conexão da interface com o ICPMS. 92
- Figura 32: Eletroferograma do Sb(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/10 s}$.
 $V = -20 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.
Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. 93
- Figura 33: Aspiração de uma solução de Cs $1 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se vazões de aspiração diferentes (em $\mu\text{L min}^{-1}$) (a) 25; (b) 40 e (c) 60. 95
- Figura 34: Eletroferograma da separação de espécies de As em pH's diferentes. 98

Figura 35: Eletroferograma da separação de espécies de As em pH's diferentes. 99

Figura 36: Eletroferograma da separação de espécies de As em concentrações

de tampão diferentes. Tampão: fosfato, contendo TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9,0
(a) 5 mmol L^{-1} ; (b) 10 mmol L^{-1} . Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V),
4. As(III). 5. AsB. 100

Figura 37: Eletroferograma da separação de espécies de As em concentrações
de tampão diferentes. Tampão: fosfato, contendo TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9,0
(a) 15 mmol L^{-1} ; (b) 20 mmol L^{-1} . Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V),
4. As(III). 5. AsB. 101

Figura 38: Eletroferograma da separação de espécies de arsênio em
concentrações de TTAB diferentes. (a) TTAB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) TTAB $1,0$
 mmol L^{-1} . Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III). 102

Figura 39: Eletroferograma da separação de espécies de arsênio em
concentrações de TTAB diferentes: (a) TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) TTAB $2,0$
 mmol L^{-1} . Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III). 103

Figura 40: Eletroferograma da separação de 5 espécies de arsênio. Tampão:
Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: NH_4NO_3
 20 mmol L^{-1} + Cs $1 \mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % de metanol, pH = 9. Vazão da bomba:
 $20 \mu\text{L min}^{-1}$, Ar = $1,0 \text{ L min}^{-1}$. I = 50 mbar/40 s. V = -28 kV. T = 20°C .
Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III), 5. AsB. 104

Figura 41: Função característica de voltagem x corrente em diferentes
temperaturas. Eletrólito: solução tampão de fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB
 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH = 9). Equipamento: Agilent HP-CE 3D. 106

Figura 42: Eletroferograma da separação de 5 espécies de arsênio.
Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*:
 NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $1 \mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % de metanol, pH = 9. I = 50 mbar/
 20 s , V = - 25kV a 22°C Pico de referência: I $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Picos: 1. As(V),
2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ cada e 5. AsB $50 \mu\text{g L}^{-1}$. 107

Figura 43: Variação da intensidade dos sinais de As e Cs em função da vazão
do gás de nebulização (argônio). Nebulizador Mira Mist CE com câmara
ciclônica (mod. Cinnabar, 20 mL) (a) As; (b) Cs. 109

Figura 44: Estudo da estabilidade do sinal de Cs ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) em função de vazões
de aspiração diferentes: a) $10 \mu\text{L min}^{-1}$, b) $30 \mu\text{L min}^{-1}$, c) $40 \mu\text{L min}^{-1}$,
d) $50 \mu\text{L min}^{-1}$. (Bomba HPLC mod. ABI 1400; nebulizador Mira Mist CE
com câmara ciclônica). 110

Figura 45: Separação de 5 espécies de arsênio. Condições experimentais:

Tampão: Fosfato 20 mmol L⁻¹ + TTAB 1,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*:

NH₄NO₃ 20 mmol L⁻¹ + Cs 1 µg L⁻¹ + 10 % metanol, pH = 9. I = 50 mbar/20 s,

V = -25 kV a 22° C, Vazão da bomba: 40 µL min⁻¹, Ar = 0,95 L min⁻¹.

Pico de referência: I: 50 µg L⁻¹; Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V),
4. As(III) 100 µg L⁻¹ cada; 5. AsB: 50 µg L⁻¹.

110

Figura 46: Curvas analíticas de cinco espécies de arsênio determinados por
CE-ICPMS [1: As(III), R² = 0,992 ; 2: DMA, R² = 0,997; 3: MMA, R² =
0,999; 4: As(V), R² = 0,996; 5: AsB, R² = 0,993].

113

Figura 47: Visualização dos picos das espécies de arsênio na região limite.

A) padrão de 2,5 µg L⁻¹ cada e b) padrão de 0,5 µg L⁻¹ cada. Picos: 1. As(V),
2. MMA(V), 3. DMA(V) e 4. As(III).

114

Figura 48: a) Exemplos Sinais transientes para As produzidos pelo sistema
FIAS 200 acoplado ao ELAN 5000 ICPMS; b) *Chemifold* com separador de
membrana utilizado neste trabalho.

116

Figura 49: Curva de calibração típica para As obtida com o sistema FIAS 200
acoplado ao ELAN 5000 ICPMS. Alça de amostragem: 250 µL.

117

Figura 50: Exemplos de curvas de calibração para determinação quantitativa
multielementar por ICPMS. Calibração externa com padronização dos sinais
pelo ródio (Rh).

118

Figura 51: Especiação de arsênio por CE-ICPMS em uma amostra de suco de
uva (Dom Cândido) com concentração total de As de cerca de 20 µg L⁻¹.

Injeção: 50 mbar/40 s, V = - 25 kV, Ar = 0,96 L min⁻¹.

127

Figura 52: Identificação dos picos em suco de uva (vide Figura 51) pela
adição de 20 µg L⁻¹ de As(V) e As(III), respectivamente.

128

Figura 53: Teores de arsênio em amostras de pêlo de crina dos três cavalos
antes e depois do tratamento com Arsenil®.

131

Figura 54: Cinética de absorção e excreção da droga Arsenil® monitorada
através de amostras de sangue (total), plasma e urina do cavalo *Cath*
Talescoean (Cta).

136

Figura 55: Cinética de absorção e excreção da droga Arsenil® monitorada
através de amostras de sangue (total) e plasma em cavalos (*Chaca e Black Bits*). 137

Figura 56: Cinéticas de excreção de Arsenil® (MMA^V) medidas através da

- determinação de As em amostras de plasma e urina do cavalo *Cath Talescoean* para o intervalo de tempo estudado, os resultados sugerem uma cinética de primeira ordem. 139
- Figura 57: Eletroferograma do Arsenil® (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Tampão: fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB 1,5 mmol L^{-1} , pH = 9. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $\mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % metanol. I = 50 mbar/5 s. V = -25 kV. Ar = 0,88 L min^{-1} . Vazão do *make up*: 40 $\mu\text{L min}^{-1}$. 141
- Figura 58: Eletroferograma obtido por CE-ICPMS da urina (1:5) do cavalo Cta no 5º dia da administração do medicamento Arsenil®. Tampão: fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB 1,5 mmol L^{-1} , pH = 9. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $\mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % methanol. I = 50 mbar/5 s. V = -25 kV. Ar = 0,88 L min^{-1} . Vazão do *make up*: 40 $\mu\text{L min}^{-1}$. 142
- Figura 59: Eletroferograma mostrando a identificação do pico DMA(V) através da adição de um spike (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) na urina do cavalo Cta no 5º dia da administração do medicamento Arsenil®. Condições experimentais semelhantes à Figura anterior. 142
- Figura 60: Eletroferograma obtido imediatamente após a fortificação da urina com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Arsenil®, sete dias e vinte e dois dias depois. Urina do cavalo Cta; condições experimentais semelhantes às da Figura 58. 144
- Figura 61: Curva de excreção de MMA(V), DMA(V) e As-total na urina do cavalo CTA. Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$. 146

Lista de tabelas

Tabela 1: Algumas interfaces entre CE e ICPMS utilizadas por diferentes autores na análise de especiação de diferentes elementos.	49
Tabela 2. Principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente. (Adaptada de Tonietto, 2005).	57
Tabela 3 – Parâmetros operacionais/instrumentais utilizados em medidas de ICPMS.	66
Tabela 4: Diferentes sistemas de introdução de amostras testados neste trabalho.	68
Tabela 5: Nome e código dos cavalos que participaram do estudo.	72
Tabela 6: Sucos de uva analisados para determinação de arsênio.	73
Tabela 7: Tempo de migração e seu desvio padrão relativo (DPR) para diferentes espécies de As separadas e determinadas pela metodologia proposta (n = 8).	111
Tabela 8: Comparação entre os desvios padrão relativos (DPR) na quantificação dos picos eletroforéticos por dois métodos diferentes (n = 8).	112
Tabela 9: Concentração média de arsênio (em $\mu\text{g L}^{-1}$) determinada em três materiais de referência por FIA-HG-ICPMS.	117
Tabela 10: Coeficientes de determinação das curvas analíticas obtidas neste trabalho por ICPMS e limites de quantificação expressa como concentração equivalente ao branco (BEC) para suco de uva diluído 1:10.	119
Tabela 11: Resultados obtidos na análise quantitativa de dois materiais de referência (urina liofilizada) no Laboratório da PUC-Rio (n=3; p = 0.05). Todas as concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$.	120
Tabela 12: Determinação de contaminantes inorgânicos em suco de uva. (ND: não determinado; * Zn, Na e Cu em mg L^{-1} , restante em $\mu\text{g L}^{-1}$. Na e Cr foram determinados por ICP OES).	122
Tabela 13: Limites Máximos de Tolerância em suco de frutas. (Fontes: Coluna 2 -ANVISA Dec. nº 55.871/1965; Coluna 3 - Commission Regulation nº 466/2001. Off. J. Europ. Communities 77:9, 2001; coluna 4 - Indian PFA Act, 1954).	123
Tabela 14: Determinação de As-total, As(III) e As(V) em suco de uva. Todas	

as concentrações de em $\mu\text{g L}^{-1}$. (*) determinado após oxidação prévia da amostra (valores da Tabela 12).	125
Tabela 15: Amostras de suco de uva e seus respectivos conservantes (INS202: sorbato de potássio; INS211: benzoato de sódio; INS220: dióxido de enxofre; INS223: Metabissulfito de sódio).	126
Tabela 16:Concentrações de arsênio em amostras de pêlo de crina de cavalo antes (18/07/2006) e depois do tratamento (14/11/2006). Concentração de As em $\mu\text{g g}^{-1}$; a distância (em cm) se refere ao segmento da amostra recolhida a partir do couro cabeludo.	131
Tabela 17: Composição inorgânica (mineralograma) de uma amostra de pêlo de crina do cavalo <i>Chaca</i> (Jóquei Clube do Brasil, Rio de Janeiro), mostrando baixas concentrações de elementos tóxicos quando comparadas com cabelo humano (vide Tabela 17).	133
Tabela 18: Dados de referência para diferentes elementos em amostras de cabelo de uma população de 1082 indivíduos (homens e mulheres com idade entre 25 e 55 anos) utilizando-se o critério 1σ , ou seja, 68% de uma distribuição log-normal). Para elementos tóxicos, o valor corresponde a $(+1\sigma)$, para elementos “nutrientes” (essenciais), o intervalo é de $(\pm 1\sigma)$, vide <i>Carneiro et al., 2002</i> .	134
Tabela 19: Concentrações médias de arsênio e outros parâmetros estatísticos para amostras de sangue e plasma dos cavalos que participaram neste estudo. Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$.	135
Tabela 20: Concentração (em $\mu\text{g L}^{-1}$) das espécies MMA(V) e DMA(V) em amostras de urina do cavalo Cta.	145
Tabela 21: Comparação dos resultados de As em urina obtidos por dois métodos independentes (CE-ICPMS e FIA-HG-ICPMS). ND = não determinado.	145