5
Materiais e Métodos

5.1.
Eletroforese capilar

As separações foram realizadas em um sistema para eletroforese capilar modelo HP-CE 3D (Agilent Technologies) equipado com detector UV-Vis e passível de adaptação para acoplamento com outros sistemas de detecção através do uso de uma interface (Figura 9).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

Figura 9: Equipamento para eletroforese capilar utilizado neste trabalho.

Este equipamento possui um carrossel com 48 posições para posicionamento de frascos de vidro ou de polipropileno (Agilent Tecnologies), para colocação de padrões e amostras. O capilar é mantido numa determinada temperatura controlada, através de um sistema de resfriamento a ar, sendo possível obter um resfriamento a água, que se apresenta mais eficaz, pelo uso de uma adaptação externa. As amostras são introduzidas no capilar pelo uso de injeção hidrodinâmica (pressão ou vácuo) ou eletrocinética (corrente) e todas as seqüências, desde a injeção até a aplicação do campo elétrico, são automatizadas. O Chemstation® (*software* da Agilent Technologies) é o programa de integração dos picos se a detecção for por UV, mas para o acoplamento com o ICPMS, o *software* Origin 7.0 (Microcal Software INC., EUA) foi utilizado para a integração.

5.1.1. Condicionamento dos capilares

Os capilares utilizados para a separação eletroforética tinham 50 ou 75 μm de diâmetro interno, sendo fabricados pela Agilent Technologies e Microsolv Tecnology Corporation, USA.

O condicionamento do capilar é uma etapa importante para garantir boas condições de operação, pois como os capilares são feitos de sílica fundida, existem nas paredes grupos silanóis que são ionizados, dependendo da solução utilizada no condicionamento. Neste trabalho, como o pH utilizado nas separações eletroforéticas foi maior que sete, pois as espécies a serem determinadas são aniônicas, o condicionamento foi feito com uma solução de hidróxido de sódio, seguido de água e tampão de separação. Todas as soluções utilizadas nesta etapa de condicionamento foram específicas para eletroforese e fabricadas pela Agilent Technologies.

Quando o capilar é utilizado pela primeira vez, o condicionamento é feito da seguinte forma:

- Rinsar o capilar com uma solução 1,0 mol L^{-1} de NaOH por 10 minutos
- Rinsar o capilar com água Milli-Q por 10 minutos
- Rinsar o capilar com o tampão de separação por 20 minutos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

A etapa de condicionamento também é realizada entre as corridas eletroforéticas, com o objetivo de regenerar a parede do capilar, removendo qualquer substância que tenha sido adsorvida. No entanto, esta etapa gasta menos tempo que a anterior sendo feita da seguinte maneira:

- Rinsar o capilar com uma solução 0,1 mol L^{-1} de NaOH por 1 minuto
- Rinsar o capilar com água Milli-Q por 1 minuto
- Rinsar o capilar com o tampão de separação por 2 minutos.

A Figura 10 apresenta os dois tipos de cassetes para uso em eletroforese capilar, dependendo do tipo de detecção.

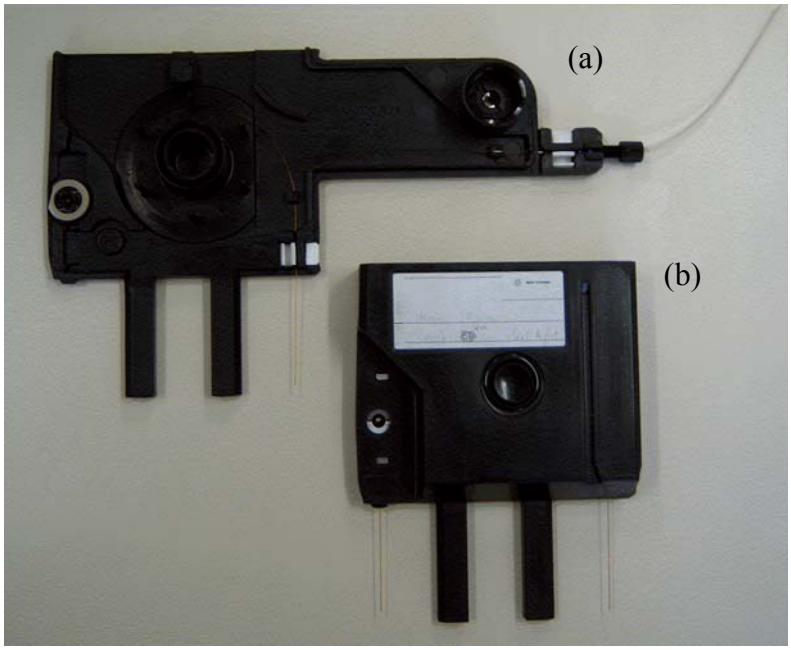

Figura 10: Cassetes e capilares para acoplamento com ICPMS (a) e para detecção UV (b).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.2.
Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS)

O equipamento utilizado para a detecção das espécies foi um ICPMS de baixa resolução (quadrupolo), modelo Elan-6000 (PerkinElmer-Sciex), mostrado na Figura 11. Para determinação de As-total pela técnica de geração de hidretos (HG) foi usado um modelo Elan 5000, do mesmo fabricante.

Figura 11: ICPMS Elan 6000 no Laboratório de Espectrometria de Massas da PUC-Rio.

As condições operacionais e instrumentais utilizadas em ICPMS são apresentadas na Tabela 3.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

Tabela 3 – Parâmetros operacionais/instrumentais utilizados em medidas de ICPMS.

Espectrômetros de Massas	ELAN 5000 e ELAN 6000	
Resolução de massa	normal (0,8 u)	
Principais massas medidas	^{75}As, ^{103}Rh, ^{85}Rb, ^{133}Cs, ^{127}I, ^{121}Sb, ^{35}Cl	
Amostrador e "skimmer"	ambos de platina	
Vazão do argônio do plasma	15,0 L min^{-1}	
Vazão de argônio auxiliar	1,0 L min^{-1}	
Vazão de argônio do nebulizador	otimizada diariamente	
	0,85 - 0,95 L min^{-1}	
Sensibilidade para Rh (cps)	50.000 - 60.000 cps para o ELAN 5000	
	200.000 -3 00.000 cps para o ELAN 6000	
% de Óxidos (CeO^+)	< 3%	
% íons bivalentes (Ba^{2+})	< 1%	
Fundo (*background)* em m/z =220	25 cps	
Modos de varredura	*Peak-hop*	*peak-hop scanning*
Tempo de permanência no pico (dwell time)	60	130 ms
Varreduras por leitura	1	2000
Número de replicatas	3	1

No acoplamento com a eletroforese capilar foi utilizado um regulador de fluxo externo (MKS Instruments Inc., EUA) para o controle da vazão do gás de nebulização, mantendo a pressão do sistema em 7,5 bar, ideal para uso com micro nebulizadores. Para isto, foi necessária a utilização de uma linha adicional de argônio, uma vez que a pressão de entrada no Elan 6000 para este gás é de apenas 5 bar, insuficiente para a maioria dos micro nebulizadores testados.

Um fator importante no acoplamento CE-ICPMS é a composição do líquido de complementação (make up). Este líquido tem duas funções: (1) fechar o circuito elétrico, permitindo assim a separação eletroforética e (2) providenciar um volume suficiente do líquido para possibilitar a nebulização com os nebulizadores atualmente disponíveis no mercado, já que a vazão eletroforética/osmótica é de apenas alguns nanolitros por minuto. No entanto, o volume aspirado deste líquido deve ser o menor possível para que não haja grande diluição da amostra originada do capilar, mas o suficiente para permitir o transporte do analito até o plasma. Ao longo do trabalho foram usadas diferentes soluções, de acordo com o tipo de nebulizador ou recomendação do fabricante. O

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

ideal é que seja utilizado um eletrólito para garantir uma boa estabilidade da corrente elétrica, gerada após a aplicação da voltagem, podendo-se usar, eventualmente, o próprio tampão de separação. Outro fator de consideração é que este eletrólito não deve causar interferências espectrais e não espectrais em ICPMS, além de ser pouco corrosivo para o sistema de introdução de amostra (nebulizador) e da interface (amostrador e skimmer). Na continuação deste texto, o líquido de complementação será denominado apenas de make up, como é de praxe na apresentação dos artigos.

Diariamente, após o espectrômetro de massa ser deixado ligado por um período de cerca de 1 hora para estabilização do sistema, procedia-se à realização de testes de repetitividade e sensibilidade do sinal analítico pela aspiração de uma solução de ródio (Rh) de 10 $\mu g\ L^{-1}$, utilizando-se o sistema padrão de introdução de amostra (nebulizador Meinhard com câmara de nebulização ciclônica). Tipicamente, sensibilidades entre 100.000 e 300.000 cps eram obtidas para esta solução de Rh. Sendo necessário, a posição da tocha em relação à interface do MS era realinhada. Em seguida, procedia-se à leitura do sinal de Cs (m/z = 133) presente no make up, o qual foi monitorado até apresentar um valor estável em diferentes vazões do gás de nebulização.

Dependendo do tipo de nebulizador utilizado (auto-aspirante ou não), foi necessário o uso de bombas para a aspiração da solução make up. Ao longo do trabalho foram comparadas três diferentes tipos: duas bombas peristálticas modelo Ismatec (Ismatec, Gmbh, EUA) e Minipuls 3 (Gilson, FR) e outra de pistão, modelo ABI 1400 (PerkinElmer). Este estudo comparativo foi realizado, fazendo-se a aspiração da solução contendo 1 $\mu g.L^{-1}$ de Cs em diferentes vazões e escolhendo-se aquela que apresentasse a melhor estabilidade na nebulização para vazões (da ordem de microlitro), faixa ideal para não provocar grandes diluições da amostra.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.3.
Interfaces utilizadas entre CE e ICPMS

A primeira fase do trabalho experimental objetivou a comparação de diferentes interfaces, para que fosse possível obter a melhor configuração nebulizador/câmara de nebulização e, assim, chegar à condição ideal de interfaceamento. Foram testados cinco diferentes conjuntos (Tabela 4).

Tabela 4: Diferentes sistemas de introdução de amostras testados neste trabalho.

Nebulizador	Câmara de Nebulização	Fabricante	Observações*
MCN	Cilindrica, sem dreno	CETAC, mod. CEI-100 (EUA)	Neb. concêntrico, operado com vazão de < 10 µL min^{-1}
MCN-100	Câmara ciclônica	CETAC (EUA)	idem,100 µL min^{-1}
MicroMist	Câmara ciclônica	Glass Expansion (AU)	idem, 200 µL min^{-1}
MicroMist	Câmara ciclônica	Glass Expansion (AU)	idem, 400 µL min^{-1}
MiraMist CE	Câmara ciclônica (mod. Cinnabar de 20 mL)	Neb.: Burgener Research (Au), Câmara: Glass Expansion	Neb. de fluxo paralelo, 3 - 10 µL min^{-1}

* vazões recomendadas pelo fabricante

Cada um destes conjuntos foi montado em uma base de plástico, contendo uma peça em formato de “X” ou “T”, por onde passa a solução make up e possui um eletrodo de platina para fazer o contato elétrico. A câmara de nebulização foi ligada ao tubo injetor da tocha do espectrômetro de massas através de uma mangueira de polietileno. Como o desempenho destas interfaces é diretamente relacionado com as suas condições de operação, maiores detalhes serão apresentados no próximo capítulo.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.4.
Preparo de reagentes e padrões

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de sais de alta pureza. Soluções estoque contendo 1000 μg L^{-1} de As(III), As(V), MMA(V), DMA(V) e arsenobetaína foram preparadas com água Milli-Q (resistividade > 16 MΩ cm). As_2O_3 e arsenato de sódio foram utilizados para o preparo das soluçãoes de As(III) e As(V), respectivamente. Os ácidos monometil arsônico (MMA) e dimetilarsínico (DMA) e a arsenobetaína foram adquiridos da Tri Chemical Laboratory Inc. (Japão). As soluções padrão de Cs, In, Rb e Li foram da marca Titrisol® (Merck), utilizados rotineiramente em nosso laboratório. Soluções estoque de 1.000 mg L^{-1} de Sb(III) e Sb(V) foram preparadas a partir de tartarato de antimônio-III ($C_4H_4KO_7Sb.0,5H_2O$) e de antimoniato de potássio ($KSb(OH)_6$), respectivamente, ambos da firma Merck. Uma solução de 1.000 μg L^{-1} de trimetil antimônio (TMSb) foi preparado a partir do sal $(CH_3)_2SbBr_2$. Os padrões de As(III), As(V) e TmSb foram cedidos pelo Dr. Joerg Feldman da Universidade de Aberdeen (Reino Unido). Diariamente, foram preparadas soluções de trabalho a partir de diluições das soluções estoque, na concentração desejada, com água Milli-Q. Todas as soluções foram filtradas com filtro de seringa de 0,45 μm (Sartorius) e guardadas na geladeira. No dia da análise, as soluções foram degaseificadas em banho de ultra-som por, no mínimo, 15 minutos.

Soluções tampão de borato e fosfato foram utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho, fazendo-se o ajuste do pH no valor desejado com solução de NaOH 0,1 ou 1,0 mol L^{-1} (todas as soluções da Agilent Technologies). A solução utilizada como make up foi preparada a partir de uma mistura do tampão de separação com Cs^+ na concentração de 1 μg L^{-1} e 10 % (v/v) de metanol (Merck), ajustando-se o pH no mesmo valor usado na separação eletroforética. NH_4NO_3 (Merck) na concentração de 20 mmol L^{-1} também foi utilizado como make up, por recomendação do fabricante de um dos nebulizadores.

A droga Arsenil® (Shering-Plough) utilizada neste trabalho tem como composição 100 mg mL^{-1} de monometilarsenato de sódio (MMA) em água. As

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

diluições necessárias foram feitas com água Milli-Q e as soluções guardadas na geladeira.

A validação das metodologias analíticas envolvendo arsênio e de alguns outros elementos foi feita utilizando um material de referência: SERONORM (urina liofilizada), distribuído pela BIORAD (EUA) e um material de referência certificado: CASS-3 (água do mar), fornecido pela National Research Council Canadá (NRCC).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.5.
Coleta e preparo das amostras

5.5.1.
Urina, sangue, plasma e pêlo

Todos os procedimentos relativos às amostras clínicas foram realizados nos laboratórios do Jóquei Clube do Brasil, sendo levadas posteriormente para o laboratório de ICPMS da PUC-Rio em caixas de isopor para as determinações de arsênio. Amostras de sangue, plasma e urina foram analisadas pela técnica de geração de hidreto (HG) acoplada a ICPMS (vide capítulo 5.6) para excluir interferências espectrais causadas pelas elevadas concentrações de cloreto nestas matrizes. Amostras de pêlo da crina de cavalo foram analisadas seguindo-se uma metodologia descrita anteriormente (Miekeley *et al*., 1998; Miekeley *et al*., 2001; Carneiro *et al*., 2002) que dispensa do uso da HG-ICPMS, uma vez que neste material as concentrações de cloreto são negligenciáveis. A análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar acoplada ao ICPMS foi realizada apenas na urina, com o objetivo de seguir o protocolo antidoping que determina o estudo da presença de arsênio na urina do animal.

As amostras de urina, sangue e pêlo foram cedidos pelo Jóquei Clube do Brasil (Rio de Janeiro) de cavalos da "escola de equitação". Inicialmente, para a determinação dos valores basais de arsênio nestas amostras, o projeto previa a coleta em 10 cavalos antes da aplicação do medicamento. No entanto, todos os procedimentos relativos à urina só puderam ser feitos em um cavalo, devido à grande dificuldade de se conseguir a coleta da urina dos outros cavalos.

Os cavalos Cath Talescoean (Cta), Chaca (Ch) e Black Bits (Bl) que participaram do estudo da cinética de excreção do arsênio receberam uma dose de 0,27 g/dia de arsênio, na forma de MMA(V) (medicamento Arsenil®) durante 5 dias seguidos. Durante 14 dias, a urina do cavalo Cath Talescoean (Cta) foi coletada e acondicionada em tubo de polipropileno de 50 mL (Sarstedt, Alemanha) e guardados em geladeira. Antes da análise, as amostras foram diluídas, com uma proporção mínima de 1:10 com água Milli-Q, filtradas e degaseificadas. Com o objetivo de verificar se o aparecimento de outras espécies na urina é resultado de processos metabólicos ou apenas devido à passagem do tempo, foi realizado um teste de estabilidade da espécie MMA(V) em urina

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

humana e do animal. Para isto, a urina (sem a presença do medicamento) foi fortificada com 500 μg L^{-1} do Arsenil® e mantida sob refrigeração, fazendo-se a análise por CE-ICPMS por vários dias.

Neste mesmo período, foram retirados 50 mL de sangue dos três cavalos e colocados em frascos de polipropileno contendo 1 mL de epinefrina para evitar a coagulação do sangue. Para a análise do sangue total foram separados aproximadamente 10 mL de cada amostra de sangue, sendo o restante centrifugado a 4.000 rpm para coleta de 15 mL de plasma. Todas as alíquotas foram acondicionadas em frascos de polipropileno com capacidade de 15 mL e guardadas na geladeira. A Tabela 5 apresenta o nome dos cavalos que participaram do estudo e o código de identificação dos mesmos.

Tabela 5: Nome e código dos cavalos que participaram do estudo.

Nome do Cavalo	Código de Identificação
Cath Talescoean	CTa
Shadow Badger	Sh
Doc Pastorean	Do
Black Bits	Bl
Detetive	De
Hillie	Hi
Campanário	Ca
Umbral Real	Um
Chaca	Ch
Cath Trilho	Ctr

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.5.2.
Suco de uva

Foram analisadas diferentes marcas de "suco de uva integral", comprados em supermercados locais. A análise de especiação de arsênio no suco de uva por CE-ICPMS foi realizada com a marca que apresentou o maior teor de arsênio total. Nos outros, As-total e As(III) foram determinados por HG-ICPMS (vide capítulo 5.6). As amostras foram filtradas em filtro de membrana (0,45 μm) no dia da análise. A Tabela 6 apresenta a marca e procedência dos sucos de uva analisados.

Tabela 6: Sucos de uva analisados para determinação de arsênio.

Identificação	Procedência
Aurora	Rio Grande do Sul
Bela Ischia	Minas Gerais
Big_Fruit	Sergipe
Casa de Bento	Rio Grande do Sul
Casa da Madeira	Rio Grande do Sul
Curumatan	Rio de Janeiro
Dom_Cândido	Rio Grande do Sul
Imbiara	Santa Catarina
Jandaia	Ceará
Maguary	Minas Gerais
Maravilha	Sergipe
Pérgola	Rio Grande do Sul
Pindorama	Alagoas
Rossoni	Rio Grande do Sul
Salton	Rio Grande do Sul
Santal	São Paulo
Serigy	Sergipe
Sinuelo	Rio Grande do Sul
Superbom_	Santa Catarina
Uva Só	Rio Grande do Sul

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

5.6.
Análise por geração de hidretos

A análise por geração de hidreto é a mais empregada para determinação de arsênio, pois a remoção do analito da matriz através da formação de um composto volátil (AsH_3) elimina as possíveis interferências espectrais neste elemento monoisotópico. Nas amostras analisadas, a alta concentração de cloretos interfere quando um espectrômetro do tipo quadrupolo sem recursos adicionais (célula de colisão/reação) é utilizado, devido à formação do íon $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$ que possui a mesma razão m/z (75) do elemento arsênio. Desta forma, o uso da geração de hidreto elimina esta interferência, além de aumentar a sensibilidade e confiabilidade dos resultados.

As determinações de arsênio total foram realizadas por HG-ICPMS, utilizando um espectrômetro de massa de modelo Elan 5000 (PerkinElmer-Sciex) conectado a um sistema de injeção em fluxo (FIAS 2000, PerkinElmer) para geração de hidreto de modo automatizado. Foram utilizadas, tipicamente, alíquotas de 1 mL das amostras de urina, sangue, plasma e suco de uva para as análises. O procedimento utiliza três etapas distintas e se baseia em metodologia semelhante à descrita por Stroh *et al*. (1993), onde maiores detalhes podem ser encontrados.

(1) Oxidação prévia de uma alíquota da amostra em tubo de polipropileno fechado com acido nítrico concentrado (qualidade Suprapur®) em bloco digestor a 80 ^{o}C durante uma noite. Este procedimento visa destruir compostos "refratários" de arsênio que não possam ser pré-reduzidos na etapa (3).

(2) Evaporação do excesso de HNO_3 que iria interferir no processo de pré-redução (3).

(3) Redução de As(V) para As(III) com 1 mL de uma solução contendo KI (5% m/v) e ácido ascórbico (5% m/v), e 3 mL de HCl concentrado, mantendo-se a mistura em repouso durante 15 min.

(4) Geração de AsH_3 em sistema FIAS 200 com borohidreto de sódio ($NaBH_4$, 0,4% m/v), utilizando-se HNO_3 (3% v/v) como carreador. Foi empregado um separador gás/líquido de membrana e o analito, na forma gasosa (arsina), foi diretamente transportado com auxílio de argônio para o tubo injetor

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

da tocha do ICPMS, dispensando uma câmara de nebulização. Utilizou-se uma alça de amostragem de 200 µL.

Para quantificação de arsênio nas amostras, foram estabelecidas curvas analíticas com cinco pontos, utilizando-se soluções analíticas adequadas e submetidas ao procedimento anteriormente descrito. A exatidão e repetibilidade dos resultados foram avaliadas através da análise de materiais de referência certificados. Parâmetros típicos de desempenho desta técnica serão mostrados no Capítulo 6.

Para se obter informações complementares sobre as formas químicas de arsênio presente nos sucos de uva, primeiramente, determinou-se a concentração de As(III) na amostra original, ou seja, sem prévia oxidação e pré-redução (etapas 1-3, vide página anterior). Numa segunda alíquota da amostra original efetuou-se a pré-redução (etapa 3) e posterior determinação do arsênio total (As-III + As-V) pela etapa 4, sendo a concentração de As-V a diferença entre os dois valores obtidos. Finalmente, a comparação destes valores com a concentração total obtida após oxidação completa do extrato com HNO_3 fornece informações sobre a fração de arsênio associada aos compostos "refratários" (p.ex. compostos orgânicos de As), que não são reduzidas nas etapas 3 e 4.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA