

6

Resultados e discussões

6.1.

Comparação crítica das interfaces CE-ICPMS

Para que o acoplamento entre a eletroforese capilar e o ICP-MS apresente bons resultados é necessária a otimização da interface. O perfeito funcionamento desta é importante para se obter um bom contato elétrico e é também, através da interface, que a solução, vinda do capilar, é transportada até o plasma. Neste trabalho, foram testadas diversas interfaces, utilizando-se nebulizadores de baixa vazão, os quais são ideais para o acoplamento entre as duas técnicas. Neste capítulo serão apresentadas as características e desvantagens de cada uma delas. A determinação da posição ideal do capilar da eletroforese em relação ao capilar do nebulizador e a obtenção do melhor fluxo do líquido do *make up* foram outros testes realizados em cada sistema montado.

6.1.1. Interface CEI-100

A primeira interface testada foi a CEI-100 de fabricação da CETAC Technology, sendo mostrada na Figura 12 juntamente com a conexão em cruz e a câmara de nebulização. Esta interface foi desenvolvida originalmente por Schaumloffel & Prange, 1999.

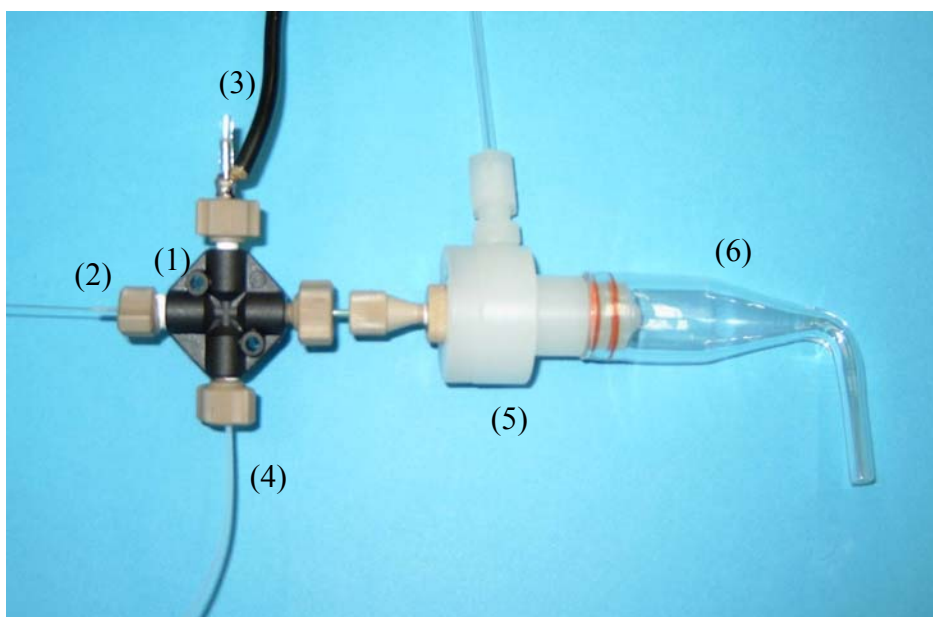


Figura 12: Interface CEI-100 (Cetac Technology, EUA). (1) conector “em cruz” mostrando as entradas: (2) do capilar (CAP), (3) do contato elétrico (CON) e (4) do tubo para conduzir o líquido *make up* (MU). (5) nebulizador micro-concêntrico (MCN) inserido na câmara de nebulização (6).

Inicialmente, foi feita a determinação da vazão ideal do *make up*. O nebulizador desta interface é auto-aspirante sendo assim, a taxa de aspiração é dependente da vazão do gás de nebulização. Desta forma, fez-se a variação da vazão de argônio numa faixa de 0,9 a 1,2 L min⁻¹ e mediu-se a taxa de aspiração do nebulizador. A vazão ideal do *make up* foi fixada em 6 µL min⁻¹, com vazão de argônio de 1,05 L min⁻¹, pois apresentou a maior sensibilidade para o sinal de In, como apresenta a Figura 13.

Após a escolha da taxa de aspiração, fez-se a medição da estabilidade do sinal de In. Para isso, uma solução de 100 µg L⁻¹ de In foi aspirada por um

determinado período de tempo e o sinal registrado, sendo um resultado típico apresentado na Figura 14.

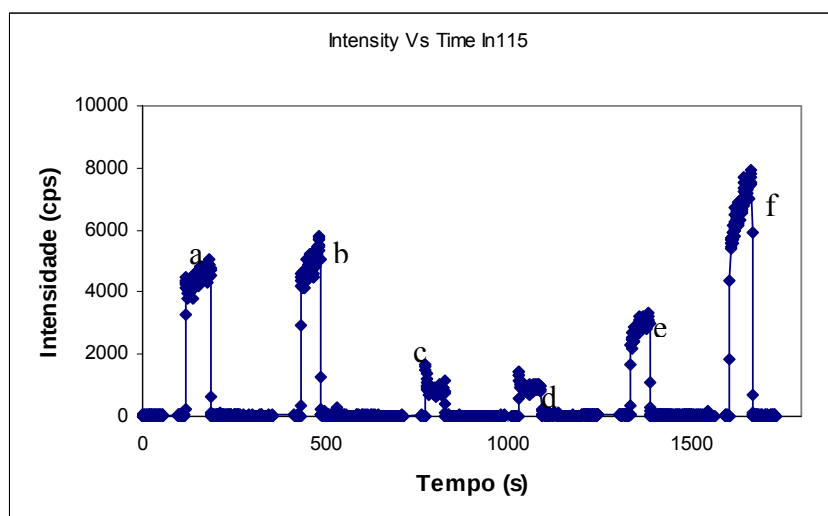


Figura 13: Variação da Taxa de aspiração em função da vazão do gás de nebulização. Solução de $\text{In } 10 \mu\text{g L}^{-1}$. a) $1,0 \text{ L min}^{-1}$, b) $1,1 \text{ L min}^{-1}$, c) $1,2 \text{ L min}^{-1}$, d) $1,2 \text{ L min}^{-1}$, e) $0,9 \text{ L min}^{-1}$, f) $1,05 \text{ L min}^{-1}$.

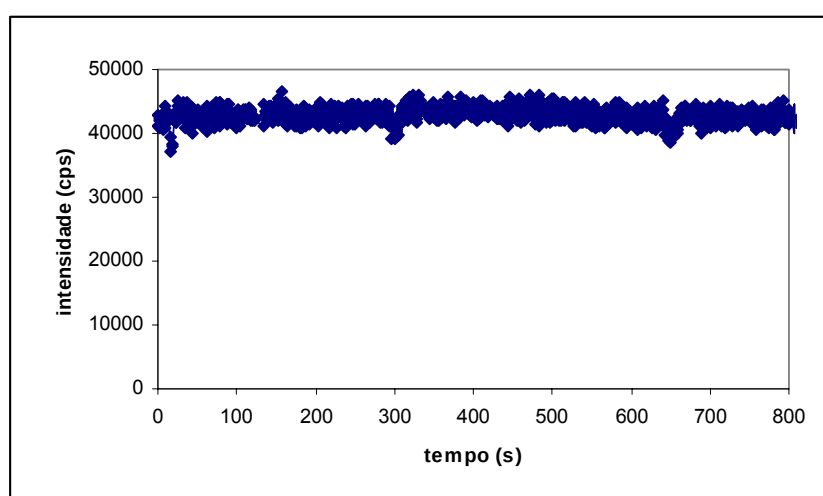


Figura 14: Medição da estabilidade do sinal de $\text{In } 10 \mu\text{g L}^{-1}$. $\text{Ar} = 1,05 \text{ L min}^{-1}$.

A última etapa na otimização da interface é a verificação da estabilidade da corrente elétrica, pois este parâmetro é determinante para que seja possível a separação por eletroforese capilar. Variando-se a voltagem aplicada, fez-se o registro da corrente gerada no interior do capilar, podendo-se observar que a corrente elétrica permanecia estável.

Com todos os parâmetros da interface otimizados, iniciaram-se os primeiros testes utilizando-se o acoplamento eletroforese capilar/ICPMS. Para isso, realizou-se a análise de soluções contendo diferentes cátions. A primeira solução analisada continha Rb ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). O tampão de separação utilizado nestes primeiros testes foi uma solução de borato 20 mmol L^{-1} em $\text{pH} = 9,3$. O make up, que deve ser, preferencialmente, um eletrólito no mesmo pH do tampão de separação para evitar alterações do pH durante o contato das duas soluções, foi borato 10 mmol L^{-1} em $\text{pH} = 9,3$. O resultado é mostrado pela Figura 15.

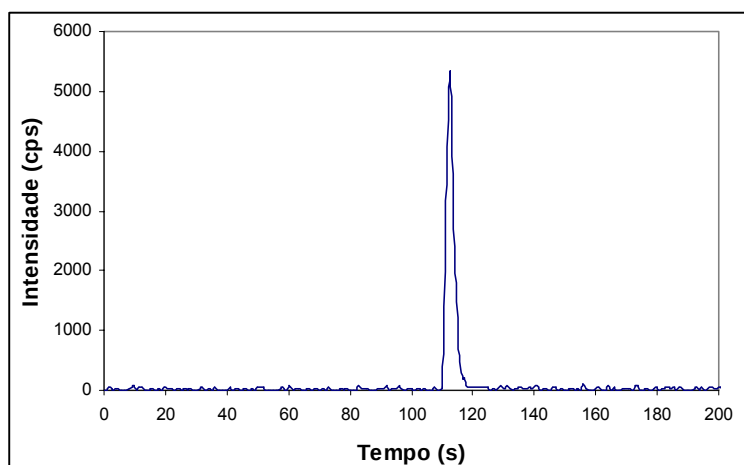


Figura 15: Eletroferograma de uma solução de Rb $200 \mu\text{g L}^{-1}$. $V = 30 \text{ kV}$. $I = 50 \text{ mbar/60s}$. Tampão: Borato 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 9,3$. *Make up*: Borato 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 9,3$.

Como a visualização de um único pico não apresentou problemas, foram iniciados os testes para obter separações de diferentes elementos. Uma solução contendo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cs e Li foi analisada, utilizando-se as mesmas condições da análise anterior. O resultado é apresentado na Figura 16.

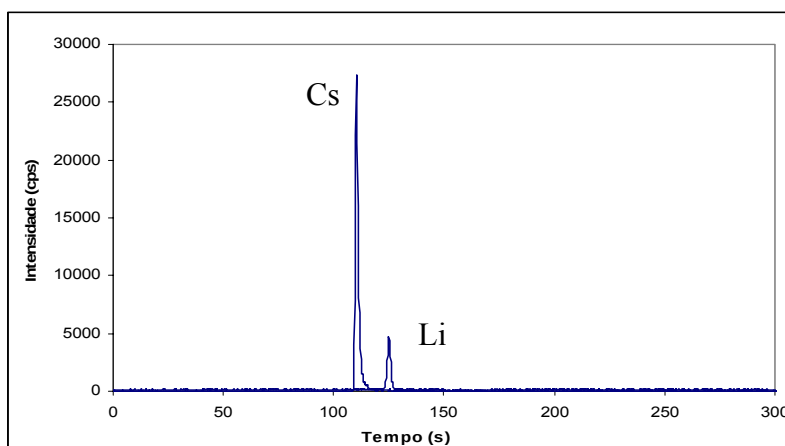


Figura 16: Separação de Cs e Li por eletroforese capilar e ICPMS. Tampão: Borato 20 mmol L⁻¹, pH = 9,3. V = - 30 kV. I = 50 mbar/60 s.

Os estudos de especiação elementar com esta interface foram iniciados, utilizando-se soluções contendo as espécies de antimônio Sb(III) e Sb(V) e TMSb (trimetil antimônio). Este elemento e as suas espécies foram escolhidos para dar subsidio a um outro estudo em andamento em nosso Departamento (Campos, 2006) no qual se encontrava dificuldades para a separação de TMSb dos demais espécies de Sb utilizando-se a cromatografia de íons (CI) acoplada com ICPMS. A separação destas espécies foi feita usando-se como eletrólito uma solução contendo 10 mmol L⁻¹ de fosfato e 0,5 mmol L⁻¹ de TTAB (brometo de tetradecil trimetil amônio) como modificador tensoativo, em pH = 6,5. No pH em que está se realizando a separação, Sb(III) e Sb(V) são aniônicos e a espécie orgânica é neutra. Desta forma, o uso do tensoativo tem como objetivo reverter o fluxo eletroosmótico, permitindo uma separação mais rápida, quando da análise de soluções aniônicas. Com isso, é possível separar Sb(III) e Sb(V), enquanto que o TMSb migra na velocidade do fluxo eletroosmótico por não apresentar carga. As primeiras soluções testadas continham apenas uma das espécies e, posteriormente, foram realizadas separações contendo diferentes espécies. Os resultados das análises são apresentados nas Figuras 17 a 20.

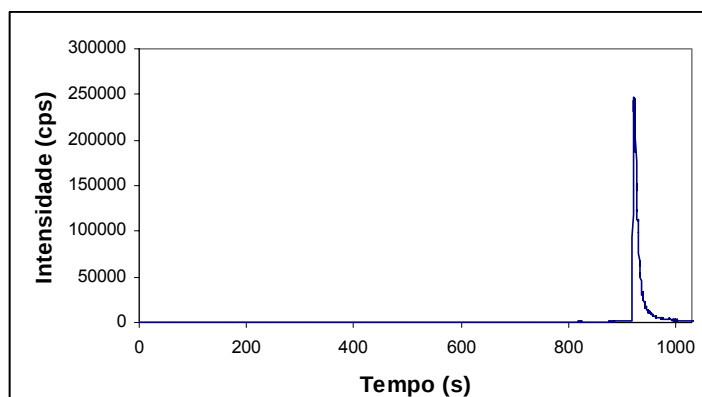


Figura 17: Eletroferograma de Sb(III) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar}/180\text{s}$. $V = -30 \text{ kV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,5$.

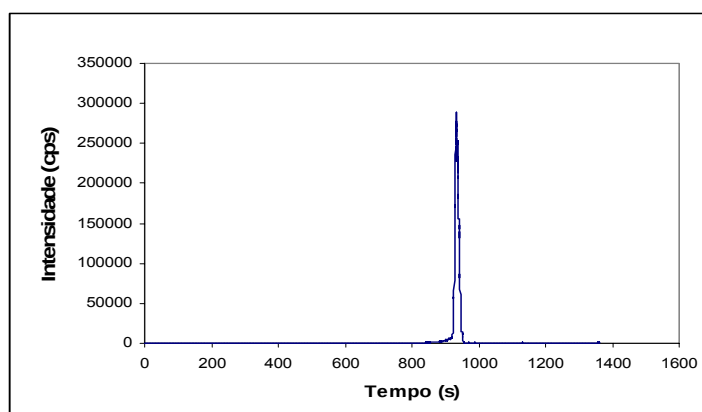


Figura 18: Eletroferograma de Sb(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar}/180\text{s}$. $V = -30 \text{ kV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,5$.

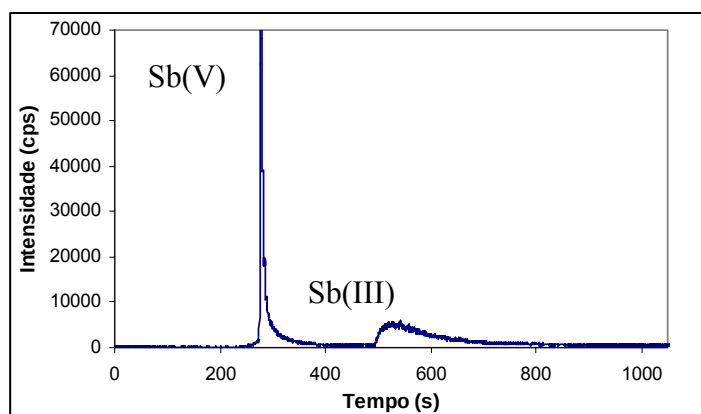


Figura 19: Separação de Sb(III) e Sb(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ cada. $I = 50 \text{ mbar}/5 \text{ s}$. $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,5$.

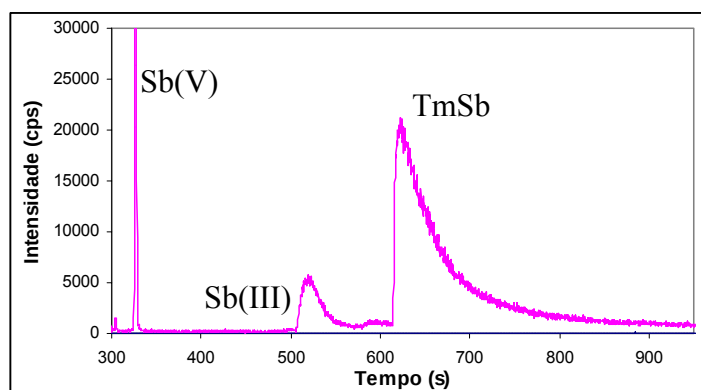


Figura 20: Separação de Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$, Sb(V) e TMSb $10 \mu\text{g L}^{-1}$ cada. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$. $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$. Make up: Fosfato 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,5$.

Observa-se na Figuras 19 e 20 uma diferença nos tempos de migração das espécies, em relação às figuras anteriores. Isto ocorre devido a uma variação do tempo de injeção da amostra, pois quando este tempo é aumentado, a presença de uma massa maior de analito, faz com que a migração ocorra mais lentamente.

Na literatura encontram-se trabalhos utilizando a CEI-100 (Yeh&Jiang, 2002), onde não são relatados problemas de operação. No entanto, a grande desvantagem observada no desenvolvimento deste trabalho, estava relacionada com falhas na aspiração pelo nebulizador. Este fato gerava, constantemente, uma interrupção do fluxo do make up no interior da interface, provocando uma instabilidade na corrente elétrica. Diversas tentativas foram feitas no sentido de regularizar a auto-aspiração, porém não foi possível solucionar o problema. Com isso, apesar desta interface apresentar no começo bons resultados na separação de diferentes elementos, foram iniciados testes com outro tipo de nebulizador.

6.1.2. O nebulizador MCN-100

O MCN-100 é também um micronebulizador pneumático-concêntrico, porém seu capilar interno possui um diâmetro maior do que o do nebulizador utilizado na interface CEI-100. Com isto, não ocorreram problemas tão frequentes com a auto-aspiração, gerando um fluxo constante de make up para o interior da interface. No entanto, como a câmara de nebulização utilizada (câmara original da interface CEI-100), foi idealizada para vazões pequenas, o uso do MCN-100 provocou uma grande condensação na câmara de nebulização. Desta forma, foi necessária uma nova otimização da vazão do gás de nebulização para que a taxa de aspiração do make up fosse reduzida a níveis que não provocassem condensação excessiva na câmara de nebulização, mas mantivessem uma boa sensibilidade do sinal analítico.

Utilizando-se uma vazão do gás de nebulização numa faixa de 0,4 a 0,7 L min⁻¹, fez-se a análise de uma solução padrão contendo Sb(V), sendo os resultados apresentados nas Figuras 21 a 24.

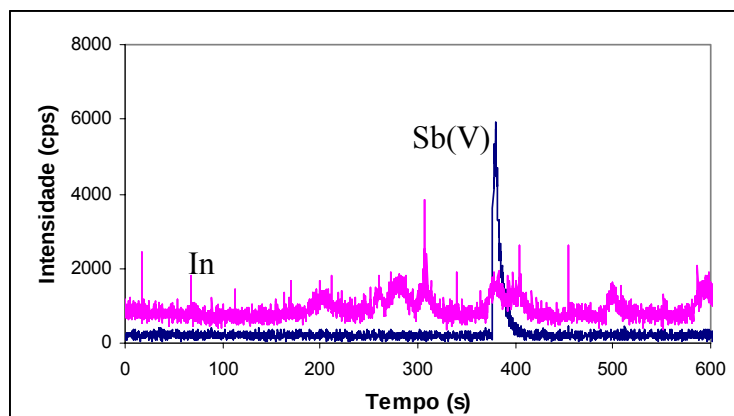


Figura 21: Sinal de Sb(V) 10 mg L⁻¹. Vazão do gás de nebulização de 0,4 L min⁻¹. Tampão: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9. Make up: Fosfato 10 mmol L⁻¹ + In 10 µg L⁻¹, pH = 9. I = 50 mbar/60 s. V = - 30 kV.

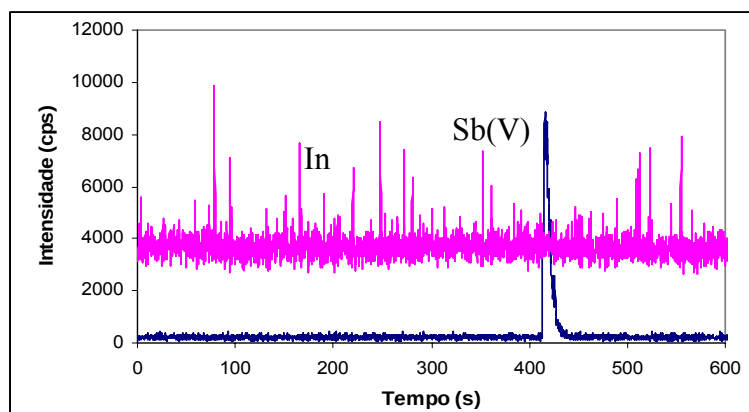


Figura 22: Sinal de Sb(V) 10 mg L^{-1} . Vazão do gás de nebulização de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} + In $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, pH = 9. $I = 50 \text{ mbar/60 s}$. $V = -30 \text{ kV}$.

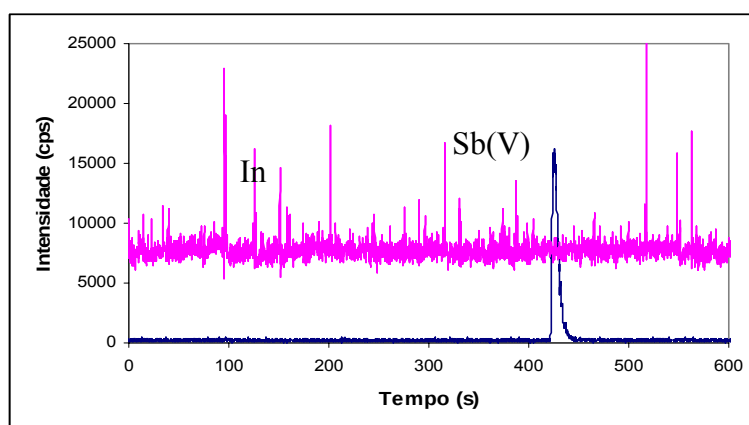


Figura 23: Sinal de Sb(V). Vazão do gás de nebulização de $0,6 \text{ L min}^{-1}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} + In $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, pH = 9. $I = 50 \text{ mbar/60 s}$. $V = -30 \text{ kV}$.

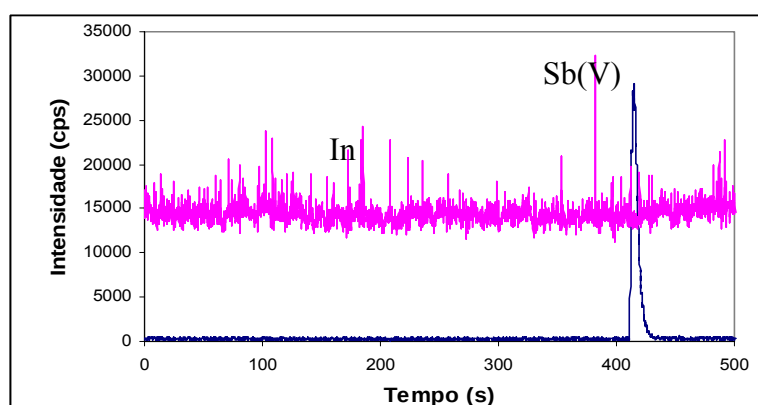


Figura 24: Sinal de Sb(V). Vazão do gás de nebulização de $0,7 \text{ L min}^{-1}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: Fosfato 10 mmol L^{-1} + In $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, pH = 9. $I = 50 \text{ mbar/60 s}$. $V = -30 \text{ kV}$.

Apesar de haver ocorrido um aumento na sensibilidade do sinal de Sb, com o aumento da vazão de argônio, o sinal de In, utilizado como referência da estabilidade da nebulização, apresentou uma grande variação, visto pelos picos espúrios na linha do sinal “estacionário” do índio. Isto ocorreu, provavelmente, devido à grande condensação na câmara de nebulização, mesmo a vazões mais baixas do gás de nebulização, fazendo que gotículas maiores fossem arrastadas para o plasma aleatoriamente. Tentou-se diminuir a condensação envolvendo a câmara de nebulização com uma manta térmica, porém o efeito obtido por este recurso não foi suficiente para manter uma nebulização estável.

Desta forma, concluiu-se que para este tipo de nebulizador era necessário o uso de uma câmara de nebulização que apresentasse saída para dreno evitando, assim, a condensação. No entanto, como não se dispunha no laboratório de uma câmara de nebulização que se adequasse à configuração do MCN-100, os testes com este sistema não foram continuados, apesar do bom resultado em relação ao formato do pico para Sb(V).

6.1.3. Nebulizador *MicroMist*

A próxima interface testada foi composta do micronebulizador concêntrico *MicroMist* (Glass Expansion, AU), de vazão nominal de 400 ou 200 $\mu\text{L min}^{-1}$, acoplado a uma câmara ciclônica (mod. Tracey de 50 mL; Glass Expansion, AU). A Figura 25 mostra o nebulizador com a adaptação em tipo cruz para entrada do capilar e do tubo do *make up*.

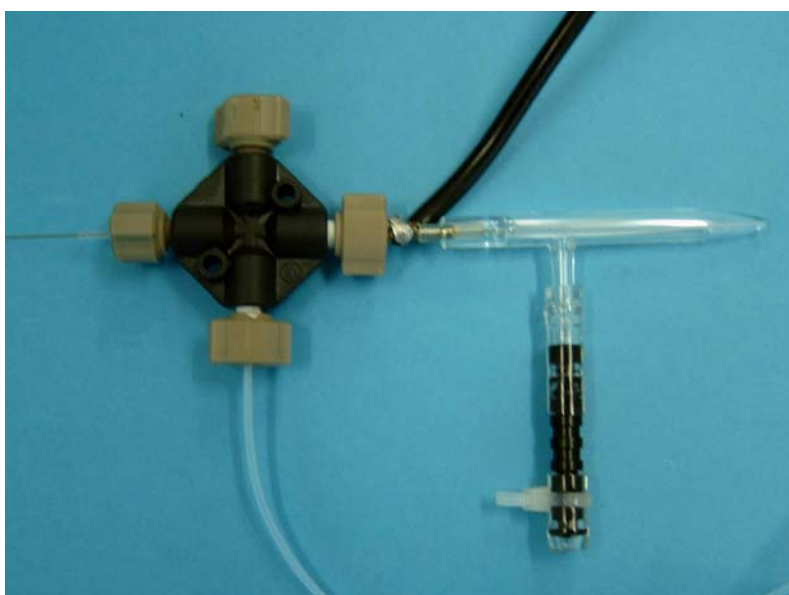


Figura 25: Interface composta de uma peça em formado de “cruz” acoplado ao nebulizador *MicroMist*.

Apesar de este nebulizador ser auto-aspirante, foi utilizada uma bomba peristáltica para aspirar a solução do *make up* para que fosse possível ter um controle da vazão deste líquido independente da vazão do gás de nebulização. Este recurso possibilita o uso de vazões do *make up* extremamente baixas, da ordem de $\mu\text{L min}^{-1}$, mantendo-se a vazão do argônio de nebulização em um valor otimizado. Apesar da instabilidade da corrente elétrica, foi possível obter bons resultados para a separação das espécies de antimônio e arsênio. Um resultado típico é apresentado na Figura 26.

Álvares-Llamas *et al.* (2002} relataram a facilidade de operação do nebulizador MicroMist, porém no desenvolvimento deste trabalho o grande problema verificado com o uso deste nebulizador foi o surgimento de pressão de retorno (back pressure), fazendo com que o make-up retornasse para o interior do capilar prejudicando ou impossibilitando, assim, a separação eletroforética. Este problema foi se agravando com o tempo, verificando-se o acúmulo de sólidos no canal do nebulizador e, apesar das diversas lavagens com água Milli-Q ou ácido nítrico, não foi possível resolver o problema.

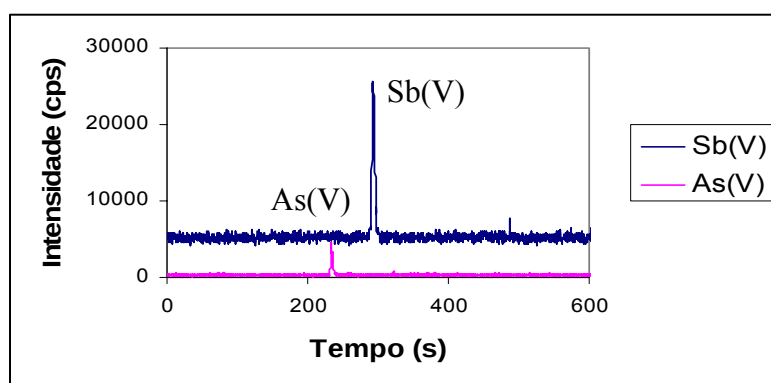


Figura 26: Separação de Sb(V) e As(V) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada. $I = 50 \text{ mbar/30 s}$. $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB 0,5 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 9$. Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs 0,5 $\mu\text{g/L}$, $\text{pH} = 9$.

Os testes foram continuados utilizando-se o nebulizador MicroMist de vazão nominal de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ que, por ter um canal interno mais estreito que o anterior, pode apresentar de forma mais severa o problema de entupimento anteriormente mencionado. No entanto, foi possível visualizar a separação de diferentes espécies de arsênio, tomando-se cuidado com o posicionamento correto do capilar da eletroforese no interior do canal do nebulizador, evitando-se assim, um possível retorno de líquido para o capilar da eletroforese. As Figuras 27 a 29 mostram os eletroferogramas individuais de três espécies de arsênio (MMA, DMA, e AsV)

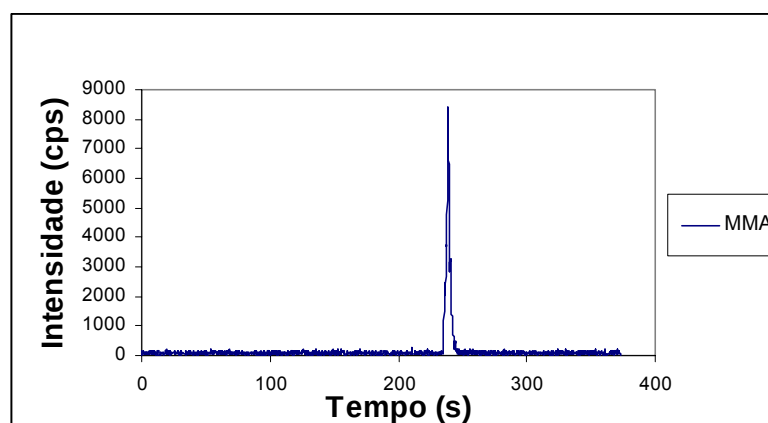


Figura 27: Eletroferograma do MMA $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$, $V = -14 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.

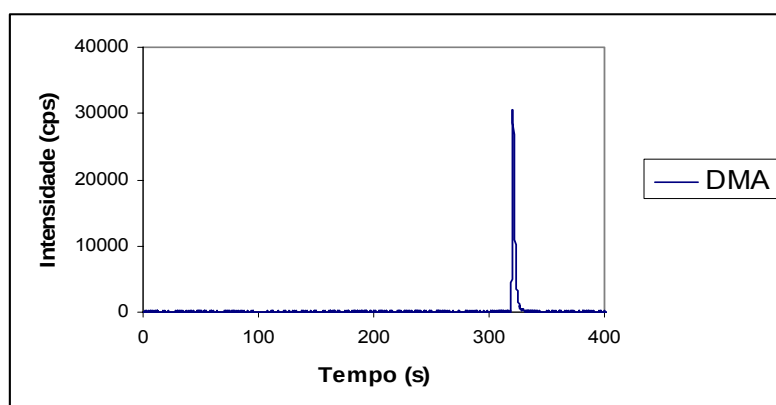


Figura 28: Eletroferograma do DMA $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$. $V = -14 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.

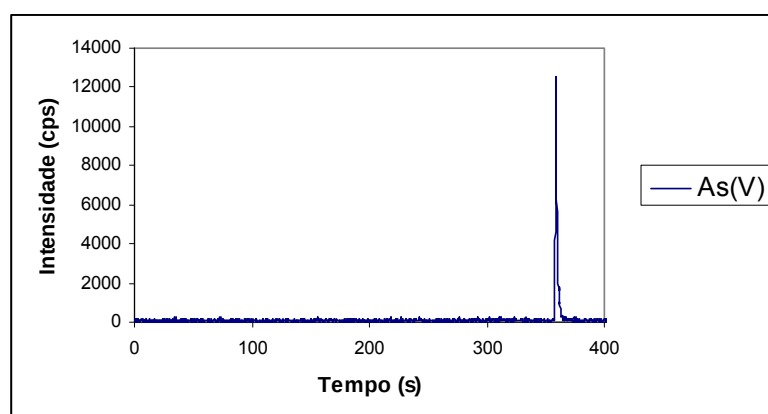


Figura 29: Eletroferograma do As(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$. $V = -30 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 10 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ In, $\text{pH} = 9$.

Apesar de boa aparência dos picos, a instabilidade da corrente elétrica foi se tornando crítica, fazendo com que diversas corridas eletroforéticas fossem interrompidas devido à falta de corrente. Diferentes posicionamentos do capilar da eletroforese, no canal de aspiração de amostra do nebulizador, foram testados, porém em nenhum momento foi possível obter uma corrente elétrica constante. Outro problema novamente observado com este nebulizador foi o entupimento, que se tornou acentuado com o passar do tempo, apesar de serem realizados todos os procedimentos de lavagem. Desta forma, foram iniciados os testes com um novo tipo de nebulizador para CE-ICPMS, recebido como doação da Burgener Research (AU) em maio de 2005.

6.1.4. Nebulizador “Mira Mist CE”

A interface utilizando o nebulizador de fluxo paralelo Mira Mist CE foi idealizada para trabalhar em vazões extremamente baixas. Por possuir um canal interno de diâmetro suficiente para passar o capilar da eletroforese até a ponta do nebulizador, e pelo princípio físico diferente de nebulização (vide esquema), não existe a possibilidade de retorno de líquido para o interior do capilar. Devido ao diâmetro muito maior do canal de amostra, este nebulizador é muito robusto frente aos problemas de entupimento observados em todos os outros testados. Além do mais, o próprio capilar pode ser utilizado para remover entupimentos, caso eles ocorram, tomando-se o cuidado de não prejudicar o *flow spoiler* com este procedimento. A Figura 30 mostra o esquema deste nebulizador, enfatizando a sua concepção diferente (vazão de amostra e do argônio em paralelo) dos nebulizadores concêntricos do tipo Meinhard.

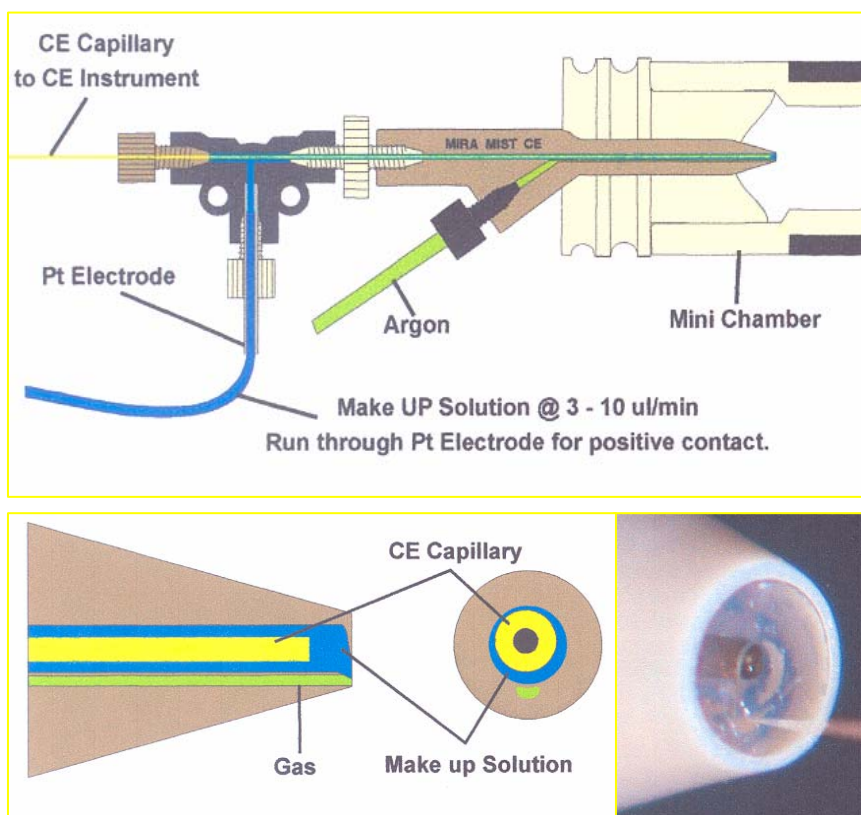


Figura 30: Apresentação esquemática da construção e funcionamento do nebulizador Mira Mist CE com conector “T” para eletroforese capilar. F = *flow spoiler*. Esquema adaptado do folheto de informação da Burgener Research (Au).

A Figura 31 mostra o conjunto CE-ICPMS utilizado na continuação deste trabalho, com a interface *Mira Mist CE* acoplada a uma câmara ciclônica de nebulização (mod. Cinnabar de 20 mL, Glass Expansion, AU).



(a)

(b)



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.

Como o nebulizador de fluxo paralelo, por princípio, não é auto-aspirante, a solução de make up precisa ser transportada através de uma bomba adequada. Testou-se, inicialmente, uma bomba peristáltica de baixa vazão (Ismatec, com mangueira de PVC de 0,19 mm de diâmetro interno) disponível em nosso laboratório. Segundo o fabricante do nebulizador, o mesmo pode ser operado com uma taxa de aspiração de $10 \mu\text{L min}^{-1}$ ou menor (vide Figura 30). Os primeiros testes com esta vazão mostraram uma grande instabilidade do sinal de Cs (presente no make-up), devido à pulsação da bomba peristáltica em vazões baixas. No entanto, foi possível obter-se um pico de Sb(V) bem definido (Figura 32).

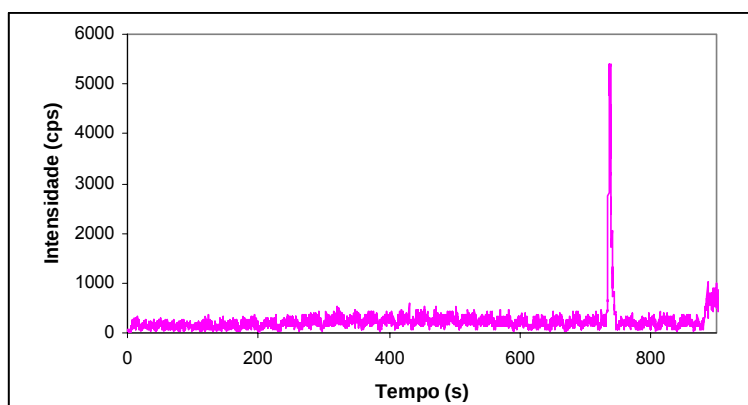


Figura 32: Eletroferograma do Sb(V) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. $I = 50 \text{ mbar}/10 \text{ s}$. $V = -20 \text{ KV}$. Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$. Make up: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{pH} = 9$.

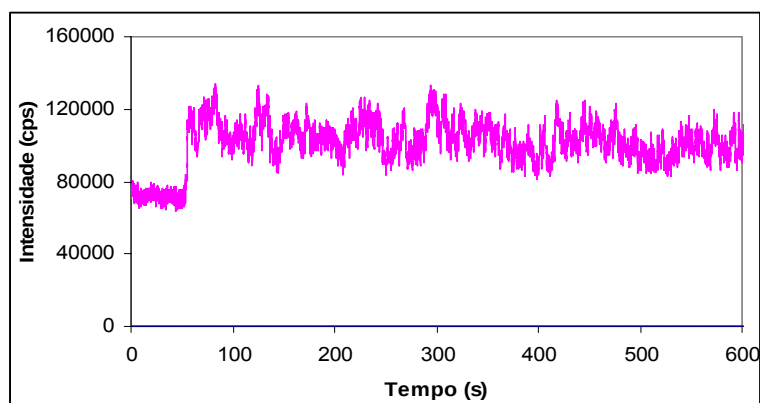
Tentando-se obter uma nebulização mais estável, foi avaliado o desempenho de duas bombas peristálticas de marcas diferentes: Gilson e Ismatec. A câmara de nebulização foi acoplada diretamente ao ICPMS, sem estar ligada à interface, para se observar apenas a influência da bomba peristáltica. A bomba Gilson tendo apresentada uma grande pulsação, mesmo utilizando-se vazões superiores a $50 \mu\text{L min}^{-1}$ foi logo descartada para aspiração do make up.

A bomba Ismatec apresentou um melhor desempenho, à medida que se trabalhou com vazões mais elevadas. O teste foi realizado numa faixa de $25\text{-}60 \mu\text{L}$

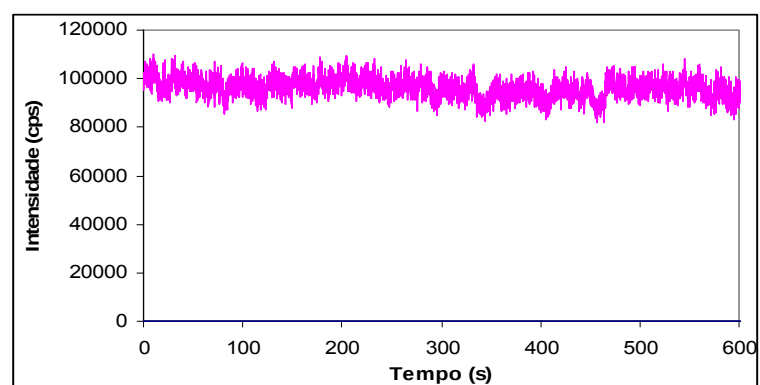
min⁻¹ avaliando-se o sinal do Cs em uma solução padrão de 10 µg L⁻¹. O resultado é apresentado na Figura 33.

A partir dos resultados obtidos, escolheu-se trabalhar com uma vazão de 40 µL min⁻¹, pois apresentou uma boa estabilidade do sinal de Cs, mantendo ainda, uma pequena diluição da amostra. No entanto, quando se fez o acoplamento CE-ICPMS, os resultados obtidos não foram semelhantes aos anteriores. Isto pode ser explicado, pela passagem do make up pelo interior do "T" da interface e pela presença do capilar no nebulizador. Como o caminho percorrido é mais difícil, devido ao estreitamento do canal de amostra na presença do capilar da eletroforese, a bomba peristáltica apresentou uma maior pulsação interferindo, assim, na estabilidade da nebulização e, conseqüentemente, do sinal. No entanto, apesar da flutuação indesejada observada nos sinais, foram realizados testes preliminares visando a otimização da separação de diferentes espécies de arsênio, uma vez que, nesta fase do trabalho, não se dispunha de bomba de melhor desempenho.

a)



b)



c)

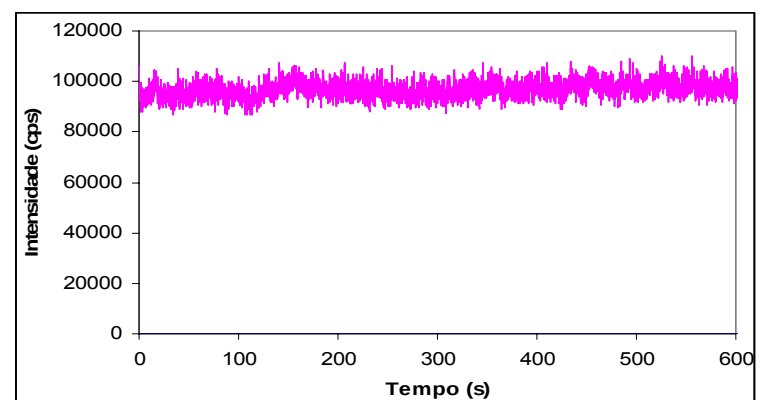


Figura 33: Aspiração de uma solução de Cs $1 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se vazões de aspiração diferentes (em $\mu\text{L min}^{-1}$) (a) 25; (b) 40 e (c) 60.

6.2.

Otimização e validação da metodologia para a especiação de arsênio

Diversos parâmetros são importantes para obter bons resultados em uma separação eletroforética, como por exemplo, a composição e pH da solução tampão, voltagem aplicada, tipo e tamanho da injeção. Dentre estes, o mais importante é a escolha correta do pH do tampão, pois dependendo do valor deste, as espécies podem estar presentes em solução como cátions, ânions ou como espécies neutras e migrarão de acordo com o pH do meio.

6.2.1.

Otimização do pH do tampão de separação

O tampão escolhido deve ter boa capacidade tamponante na região de trabalho, sendo ideal permanecer numa faixa do $pK_a \pm 2$. Fosfato e borato são os tampões mais usuais nas separações eletroforéticas. Com $pK_{a2} = 7,2$; o fosfato está adequado para ser utilizado em uma região de 5,2 a 9,2, tendo sido escolhido para os primeiros testes de otimização da metodologia. Quando não se tem conhecimento do pK_a dos analitos, deve-se variar o pH da solução em intervalos de 0,5 unidades de pH. No caso da especiação de arsênio, em pH neutro as espécies As(V), $pK_a = 2,3$, MMA(V), $pK_{a1} = 3,6$ e DMA(V), $pK_{a1} = 6,2$ são ânions, o As(III) como óxido arsenioso, $pK_a = 9,3$ é uma espécie neutra, enquanto que a arsenobetaina é um zwitterion (Barra *et al.*, 2000). Sendo assim, foram preparadas soluções de fosfato 15 mmol L^{-1} em uma faixa de pH de 7,5 a 9,5 para permitir a separação de todas as espécies. A presença no tampão do tensoativo TTAB, como modificador do fluxo eletroosmótico, é vantajosa, pois com a reversão da carga da parede do capilar os analitos e o fluxo eletroosmótico migram na mesma direção, fazendo com que as corridas eletroforéticas sejam mais rápidas. O make up recomendado pelo fabricante deste nebulizador foi uma solução contendo NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % de metanol, sendo o pH da solução ajustado para o mesmo valor da solução do tampão de separação. A presença do Cs na solução do make up tem a função de monitorar a estabilidade da nebulização e verificar a sensibilidade diária do ICPMS e o metanol tem como objetivo diminuir a constante dielétrica da solução, favorecendo a formação de gotas menores, aumentando assim, a eficiência do transporte e da ionização no

plasma. Na eletroforese capilar, existe sempre a possibilidade de ocorrer variações no tempo de migração das espécies. Para compensar este efeito, pode-se adicionar à amostra um elemento que atue como referência para normalizar as variações no tempo de migração e área dos picos. Desta forma, foi adicionado à amostra o íon I^- , pois sendo um ânion, migrará no mesmo sentido dos íons da amostra. Além disso, devido ao primeiro potencial de ionização ser relativamente baixo para um íon do grupo VII (10,45 eV) a sensibilidade de detecção deste íon por ICPMS é suficientemente alta para a finalidade pretendida. Em todas as corridas a concentração das espécies foi mantida em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ cada e as condições experimentais foram: Tampão de fosfato 15 mmol L^{-1} + TTAB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $I = 50 \text{ mbar/20 s}$, $V = -28 \text{ kV}$, $T = 22^\circ \text{ C}$, vazão do make up: $20 \mu\text{L min}^{-1}$ e vazão do gás de nebulização = $0,99 \text{ L min}^{-1}$. As Figuras 34 e 35 apresentam eletroferogramas característicos obtidos nestes testes de otimização.

Verifica-se pela Figura 34 que entre o pH 7,5 e 8,5 não há boa separação entre o As(III) e o DMA(V). A resolução entre estes picos só é satisfatória no pH = 9,0 (Figura 35), onde se obteve uma boa separação das cinco espécies de arsênio. O pH = 9,5, apesar de ter levado a uma boa separação das espécies, não é um pH adequado, pois já está fora da região do $\text{pK}_a \pm 2$, provocando uma diminuição da capacidade do tampão. Neste pH foi verificado, após diversas corridas, que uma pequena variação no tempo de migração provocava a sobreposição dos picos. Desta forma, escolheu-se realizar as separações em pH = 9, pois há uma boa definição dos picos e o tempo de análise ficou próximo ao obtido em pH = 9,5. O pico da arsenobetaina só foi visualizado após a aplicação de pressão ao sistema, juntamente com a voltagem. Este recurso pode ser utilizado quando uma das espécies de interesse não migra na mesma velocidade das demais, fazendo com que o tempo de análise seja muito grande, aumentando os efeitos de difusão e convecção com conseqüente alargamento do pico. Desta forma, foi aplicada uma pressão de 50 mbar a partir de 7 min, fazendo com que a arsenobetaina migrasse mais rapidamente em todas as corridas. No entanto, após diversas tentativas de melhorar o formato do pico desta espécie, através da variação do valor da pressão e/ou do momento a ser aplicada, o pico da arsenobetaina continuou largo.

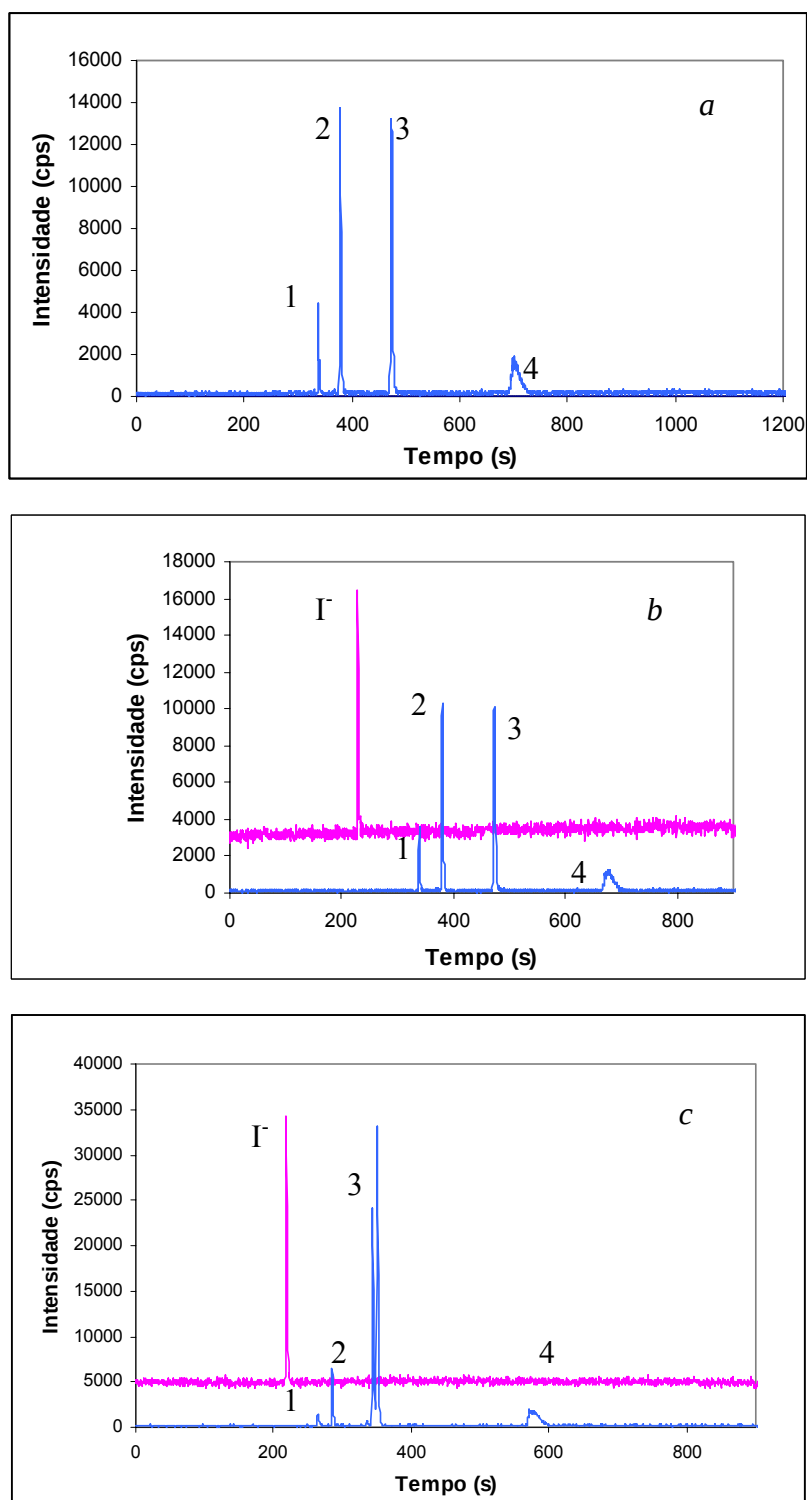


Figura 34: Eletroferograma da separação de espécies de As em pH's diferentes.
pH: (a) 7,5; (b) 8,0 e (c) 8,5 Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V)+AsIII, 4. AsB.

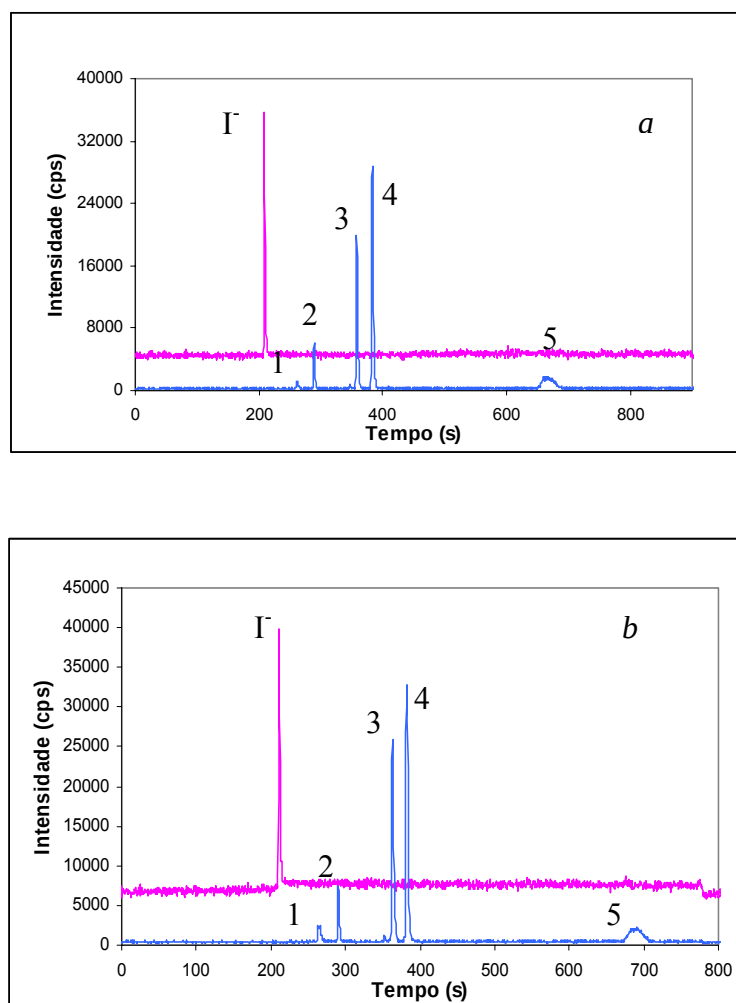


Figura 35: Eletroferograma da separação de espécies de As em pH's diferentes.
pH: (a) 9,0; (b) 9,5. Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V) 4. AsIII, 5. AsB.

6.2.2.

Otimização da concentração do tampão de separação

Fixando o pH do tampão em 9,0, variou-se a concentração de fosfato dentro de uma faixa de 5 a 25 mmol L⁻¹, mantendo-se constantes as demais condições. As Figuras 36 e 37 mostram os eletroferogramas obtidos.

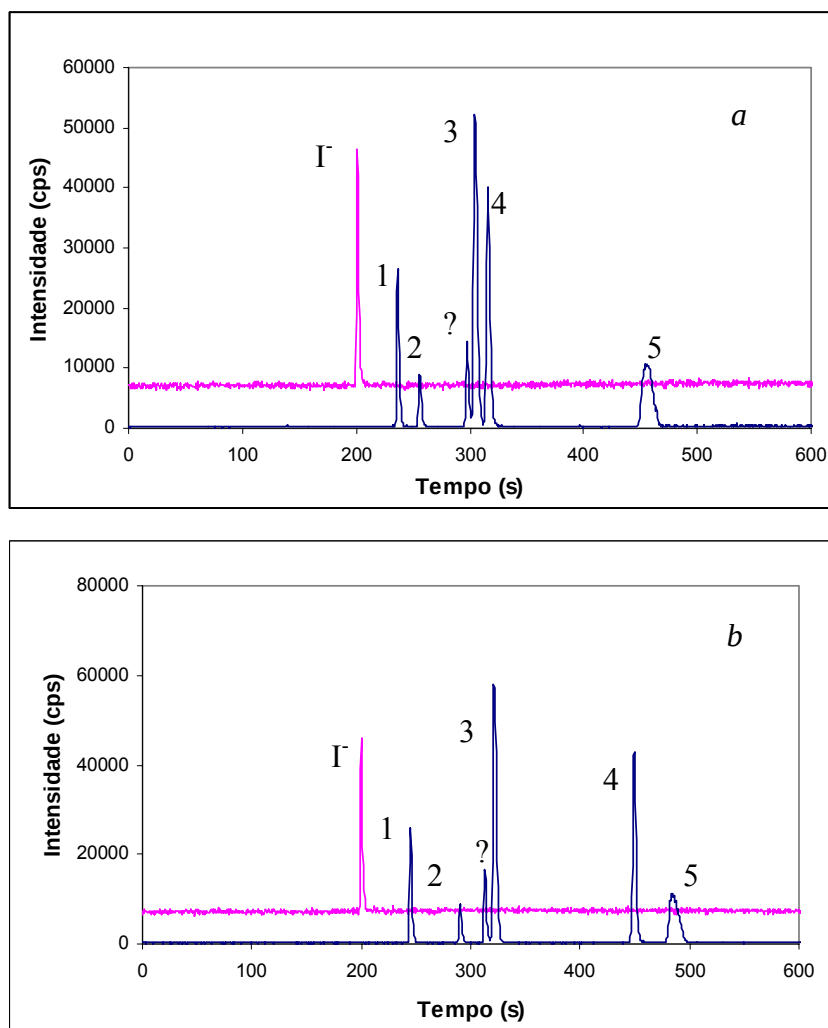


Figura 36: Eletroferograma da separação de espécies de As em concentrações de tampão diferentes. Tampão: fosfato, contendo TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9,0. (a) 5 mmol L⁻¹; (b) 10 mmol L⁻¹. Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III). 5. AsB.

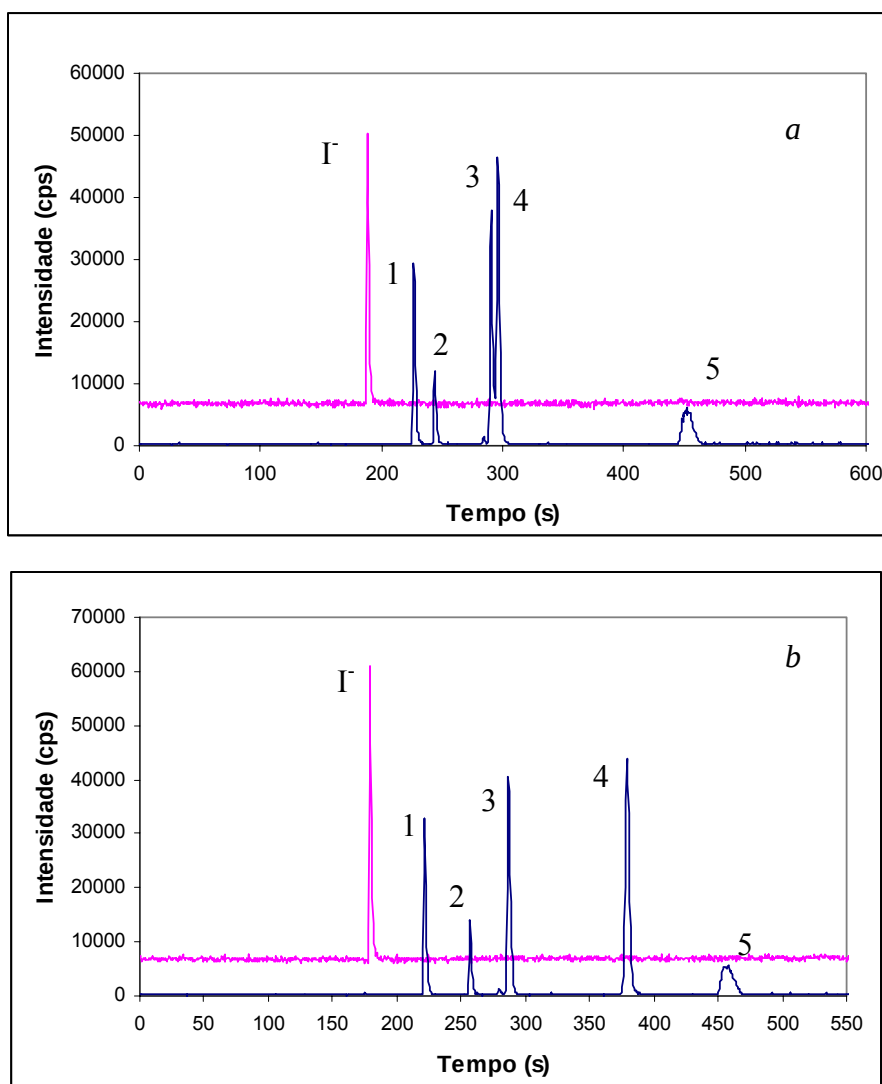


Figura 37: Eletroferograma da separação de espécies de As em concentrações de tampão diferentes. Tampão: fosfato, contendo TTAB 0,5 mmol L⁻¹, pH = 9,0. (a) 15 mmol L⁻¹; (b) 20 mmol L⁻¹. Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III). 5. AsB.

De acordo com os resultados, escolheu-se a concentração de 20 mmol L⁻¹ para o tampão, pois apresentou uma boa separação dos picos das espécies de arsênio. Em concentrações mais baixas, a separação entre os picos de DMA e As(III) não é bem resolvida, provavelmente devido a baixa força iônica do tampão.

Uma vez otimizadas as condições de pH e concentração do tampão, prosseguiu-se o trabalho com um estudo sobre o efeito do modificador tensoativo TTAB (brometo de tetradeciltrimetil amônio) na separação das espécies.

6.2.3.

Otimização da concentração do tensoativo TTAB

Fixando o pH em 9,0 e a concentração do tampão de separação em 20 mmol L⁻¹, variou-se a concentração do tensoativo TTAB em uma faixa de 0,3 a 2,0 mmol L⁻¹, mantendo-se as demais condições experimentais. Os resultados são apresentados nas Figuras 38 e 39.

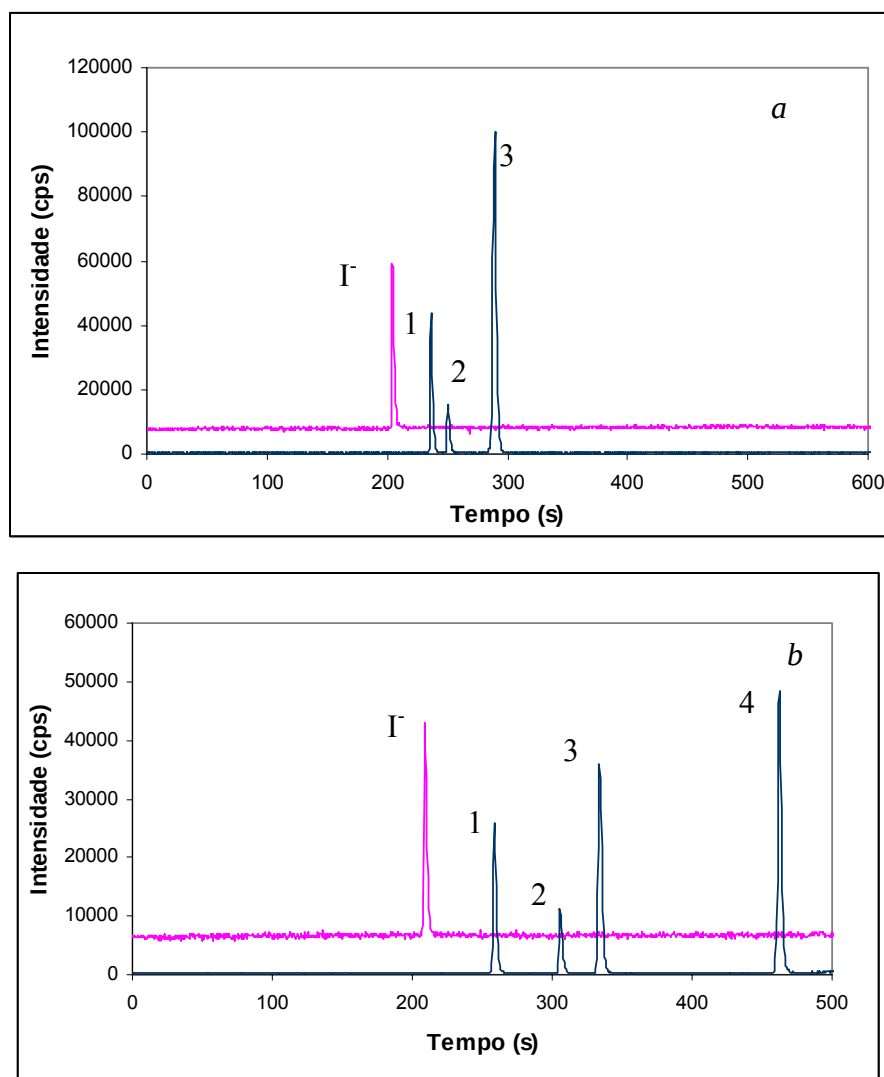


Figura 38: Eletroferograma da separação de espécies de arsênio em concentrações de TTAB diferentes. (a) TTAB 0,3 mmol L⁻¹; (b) TTAB 1,0 mmol L⁻¹. Picos: 1.As(V), 2.MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III).

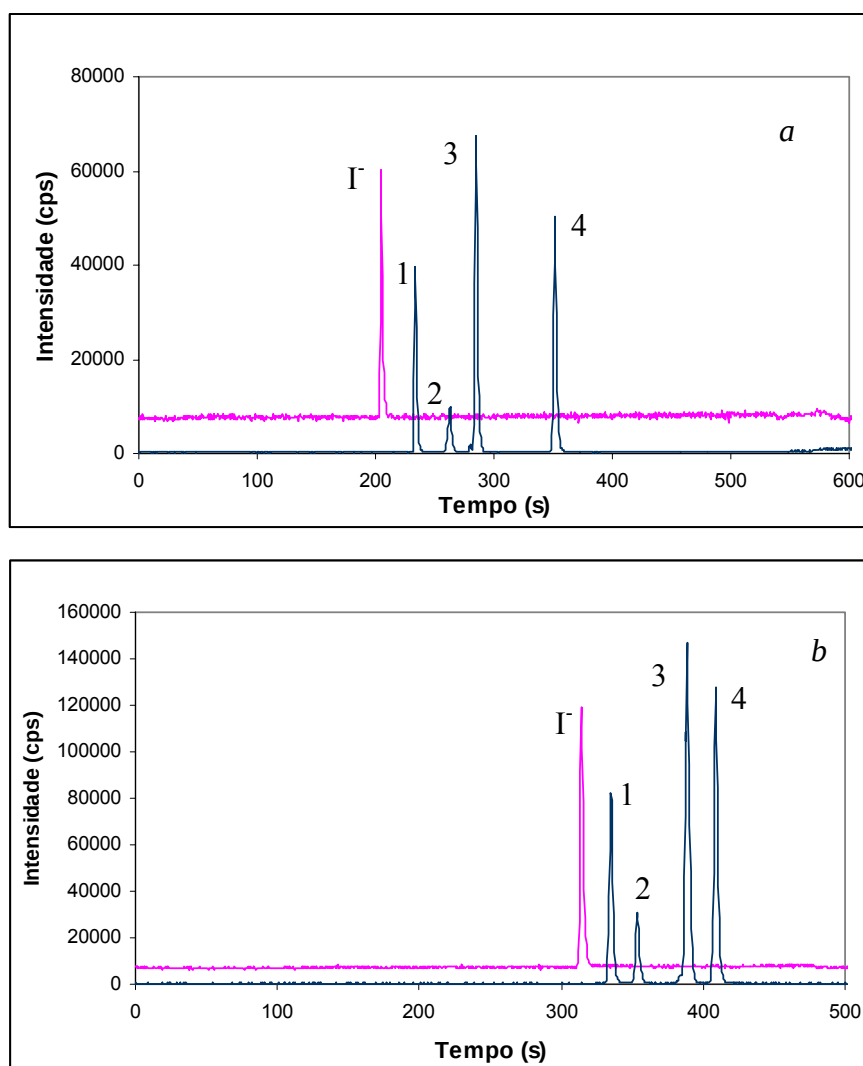


Figura 39: Eletroferograma da separação de espécies de arsênio em concentrações de TTAB diferentes: (a) TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) TTAB $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III).

As Figuras 38 e 39 mostram que a concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o tensoativo TTAB resultou em melhor separação dos quatro picos, entretanto, nas concentrações de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ verifica-se também perfeita separação entre as espécies. Uma comparação dos quatro eletroferogramas revela que um aumento da concentração do agente tensoativo tem um efeito maior sobre o As(III), aumentando a sua velocidade eletroforética em relação às demais espécies, visto pelo encurtamento progressivo da distância entre os picos 3 e 4. Optou-se pela concentração de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de TTAB para a continuação deste trabalho, pois obteve-se adequada separação das espécies em menor tempo de

corrida. Este aspecto é importante quando se utiliza o ICPMS como detector em CE, pois devido ao elevado custo do equipamento e de sua operação, em geral, multielementar e multiusuária, é vantajosa uma menor ocupação do instrumento em separações cromatográficas/eletroforéticas.

Com todos os parâmetros relacionados ao tampão de separação otimizados, fez-se a análise de uma solução padrão de cinco espécies de arsênio. A Figura 40 mostra o eletroferograma obtido.

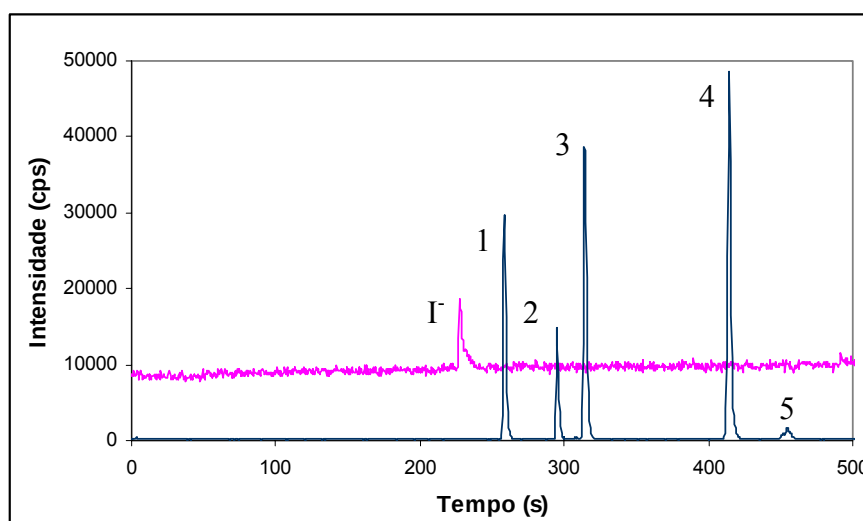


Figura 40: Eletroferograma da separação de 5 espécies de arsênio. Tampão: Fosfato 20 mmol L⁻¹ + TTAB 1,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*: NH₄NO₃ 20 mmol L⁻¹ + Cs 1 µg L⁻¹ + 10 % de metanol, pH = 9. Vazão da bomba: 20 µL min⁻¹, Ar = 1,0 L min⁻¹. I = 50 mbar/40 s. V = -28 kV. T = 20 °C. Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III), 5. AsB.

Como mencionado anteriormente, o último pico referente à espécie arsenobetaina só é visualizado, dentro do intervalo da corrida, se for aplicada pressão ao sistema, juntamente com a voltagem, acelerando assim, sua migração. As variações verificadas no tempo de migração das espécies, comparando-se às Figuras 39 e 40, são devido a mudanças no tempo de injeção da amostra.

6.2.4. Otimização da voltagem

A escolha da voltagem é um parâmetro importante, pois vai influenciar no tempo de corrida e na resolução dos picos. Para esta avaliação, fez-se um estudo entre a voltagem aplicada e a corrente desenvolvida no interior do capilar. Para se obter melhores resultados, o ideal é permanecer na faixa linear da curva. Se isto não for possível, devido a um aumento excessivo do tempo de análise, devem ser evitados valores de correntes superiores a 100 μA , pois a refrigeração do sistema (circulação de ar no compartimento do capilar) não seria suficiente para evitar um aumento excessivo de temperatura. O estudo foi realizado em três diferentes temperaturas e os resultados são apresentados na Figura 41.

Conforme há um aumento na temperatura, o desvio da linearidade se acentua; por isso, escolheu-se trabalhar a 22 °C, pois nesta temperatura é possível realizar corridas com voltagens mais elevadas e reduzir os tempos de migração. .

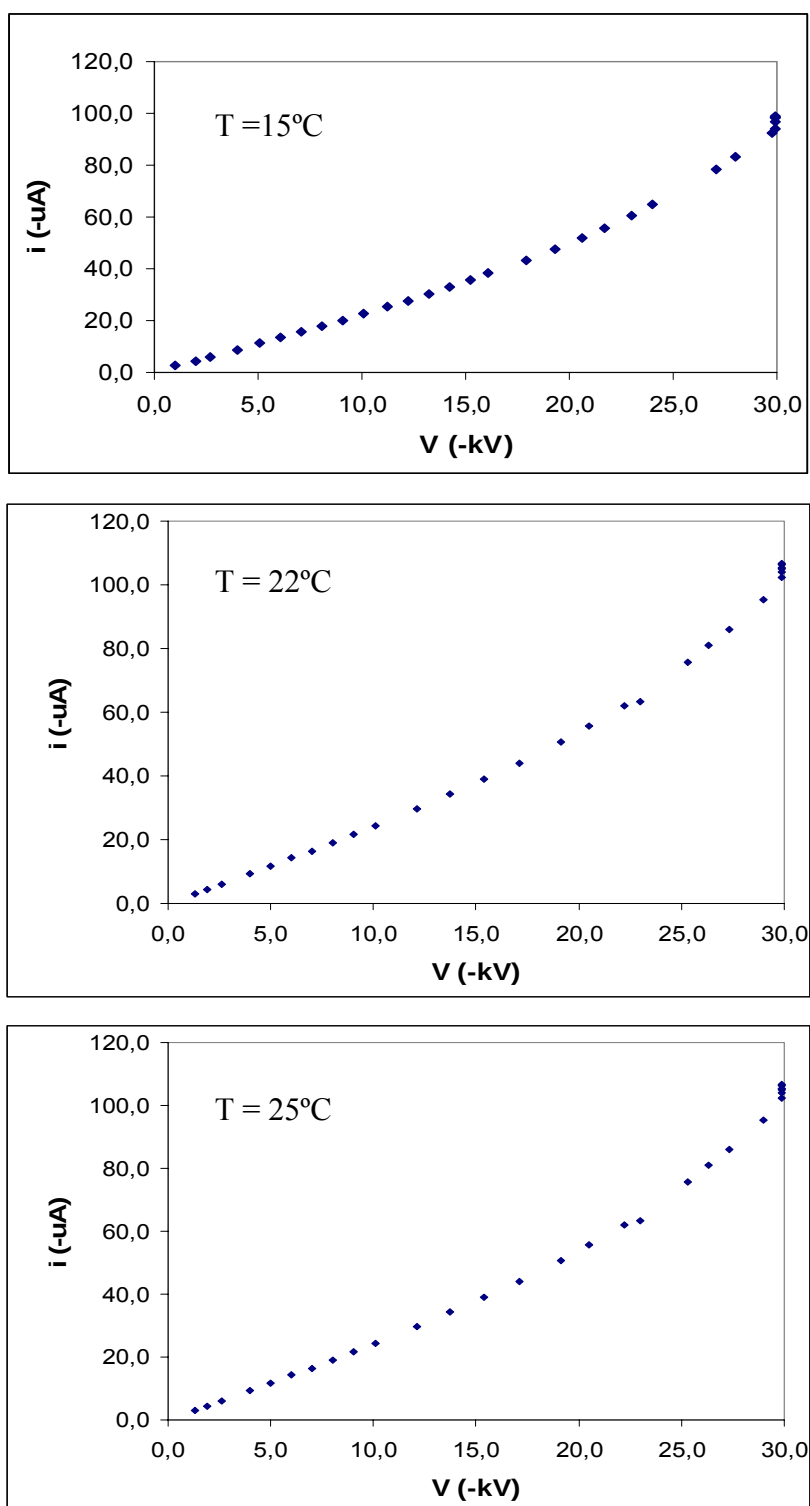


Figura 41: Função característica de voltagem x corrente em diferentes temperaturas. Eletrólito: solução tampão de fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9$). Equipamento: Agilent HP-CE 3D.

Foi realizada uma separação das cinco espécies de arsênio após a otimização de todos os parâmetros relacionados à separação eletroforética. A Figura 42 apresenta o eletroferograma obtido.

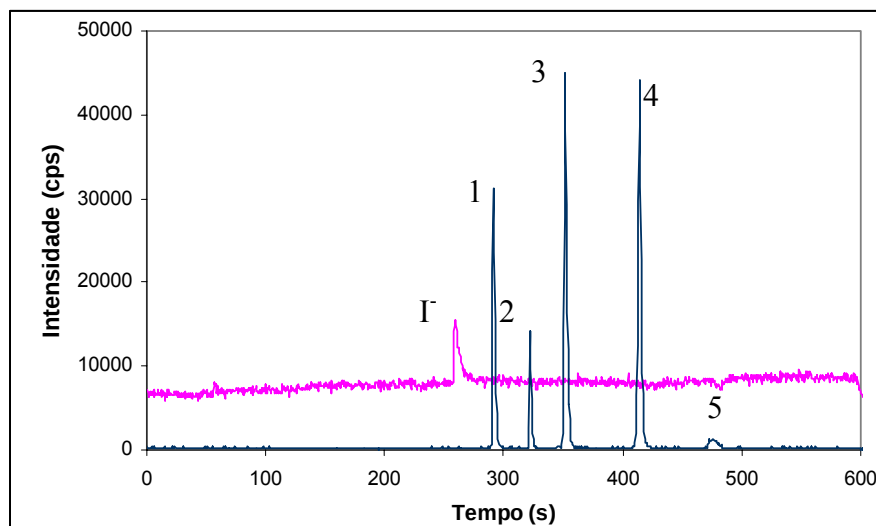


Figura 42: Eletroferograma da separação de 5 espécies de arsênio. Tampão: Fosfato 20 mmol L⁻¹ + TTAB 1,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*: NH₄NO₃ 20 mmol L⁻¹ + Cs 1 µg L⁻¹ + 10 % de metanol, pH = 9. I = 50 mbar/ 20 s, V = - 25kV a 22 °C Pico de referência: I⁻ 50 µg L⁻¹. Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V), 4. As(III) 100 µg L⁻¹ cada e 5. AsB 50 µg L⁻¹.

6.2.5.

Parâmetros relacionados à introdução da amostra no ICPMS

A vazão de argônio como gás de nebulização foi otimizada a partir da aspiração, por um determinado período de tempo, de uma solução contendo Cs e As. O resultado mostrou que a vazão $1,0 \text{ L min}^{-1}$ apresenta uma maior sensibilidade para o arsênio, enquanto que para o cézio seria possível trabalhar em vazões superiores (Figura 43). Uma maior vazão de argônio na parte central do plasma causa um “resfriamento” do mesmo que afeta, especialmente, o rendimento de ionização de elementos com alta energia de ionização, neste caso, As (9,81 eV). No entanto, o ideal é fazer uma otimização diária no equipamento para que se possa chegar às melhores condições de trabalho para o analito de interesse (As).

Apesar de se trabalhar nas condições ideais de separação, verificou-se que no cálculo da repetitividade para 10 corridas sucessivas, o desvio padrão relativo (DPR) apresentou valores superiores a 20 % para todas as espécies de arsênio. Estes valores elevados do DPR foram atribuídos à instabilidade da nebulização provocada pela grande pulsação da bomba peristáltica quando operada a tão baixas vazões ($<50 \text{ }\mu\text{L}$). Para melhorar a repetitividade nas medições, substituiu-se a bomba peristáltica por uma bomba HPLC de duplo pistão (mod. ABI 1400, PerkinElmer) cedida, gentilmente, pelo CENPES. Resultados sobre a repetitividade dos sinais obtidos com esta nova bomba, na faixa de aspiração de 10 a $50 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, são mostrados nas Figura 44.

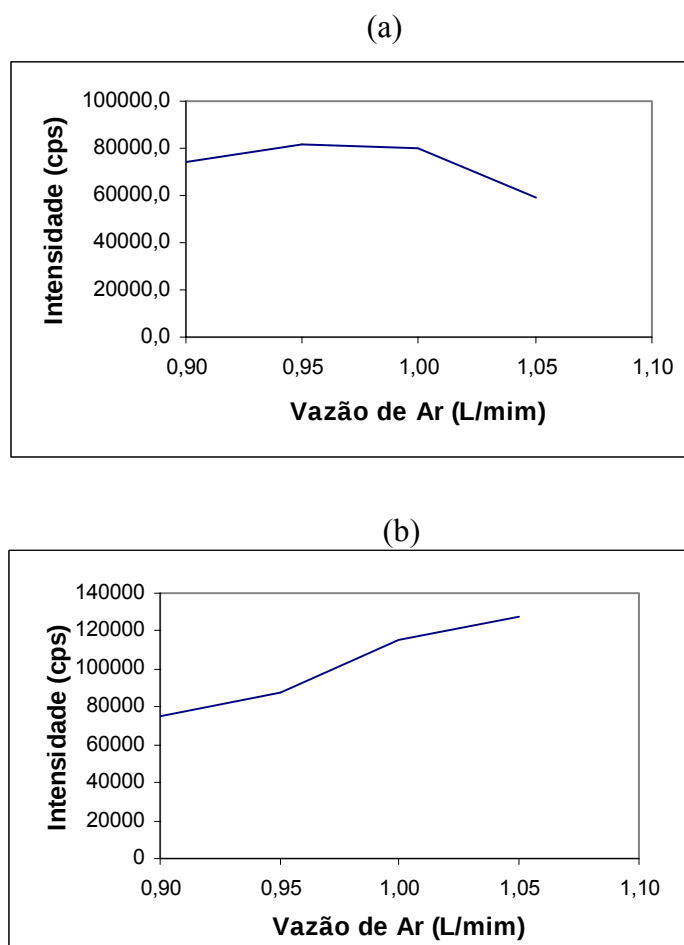


Figura 43: Variação da intensidade dos sinais de As e Cs em função da vazão do gás de nebulização (argônio). Nebulizador Mira Mist CE com câmara ciclônica (mod. Cinnabar, 20 mL) (a) As; (b) Cs.

A bomba de pistão apresentou melhores resultados que a bomba peristáltica usada anteriormente. No entanto, há também uma grande instabilidade do sinal (Cs) a vazões muito baixas. A partir de $40 \mu\text{L min}^{-1}$, a repetitividade do sinal melhorou substancialmente, sendo então esta vazão escolhida para a continuação do trabalho. A Figura 45 apresenta novamente a separação dos cinco espécies de arsênio, desta vez com o sistema e todos os parâmetros operacionais otimizados.

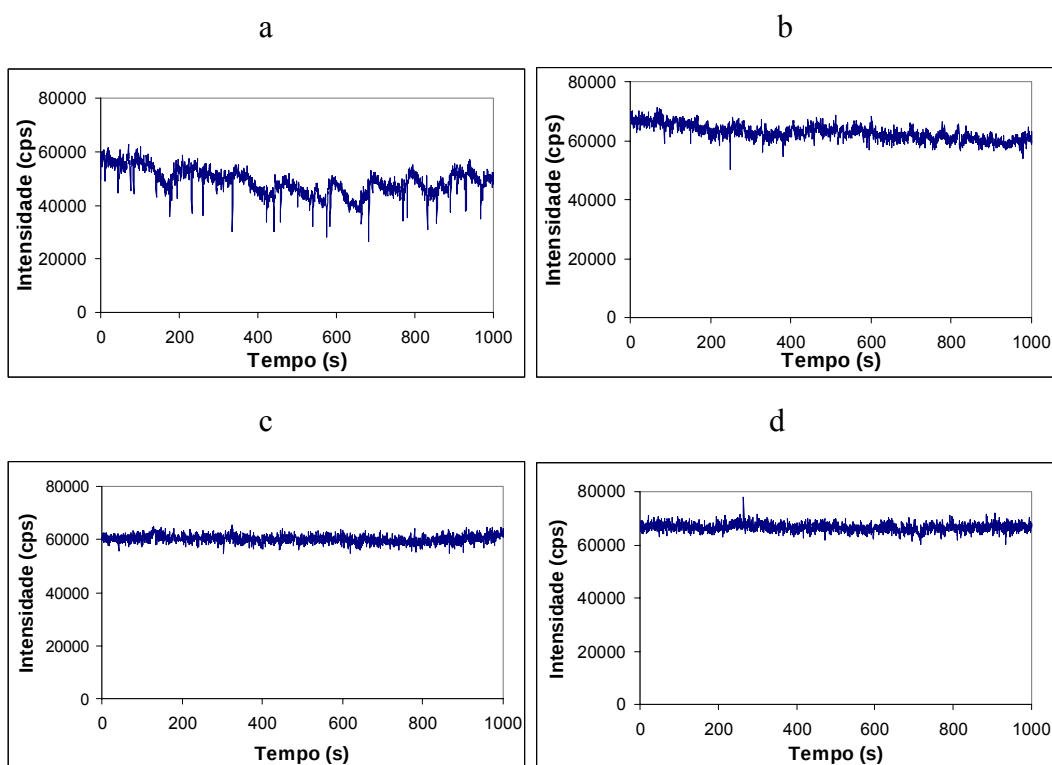


Figura 44: Estudo da estabilidade do sinal de Cs ($1\mu\text{g L}^{-1}$) em função de vazões de aspiração diferentes: a) $10\mu\text{L min}^{-1}$, b) $30\mu\text{L min}^{-1}$, c) $40\mu\text{L min}^{-1}$, d) $50\mu\text{L min}^{-1}$. (Bomba HPLC mod. ABI 1400; nebulizador Mira Mist CE com câmara ciclônica).

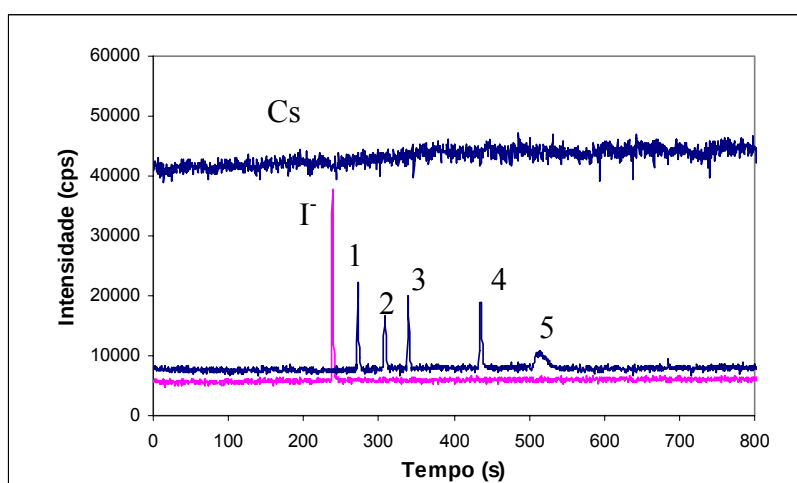


Figura 45: Separação de 5 espécies de arsênio. Condições experimentais: Tampão: Fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $1,5\text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $1\mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % metanol, pH = 9. $I = 50\text{ mbar}/20\text{ s}$, $V = -25\text{ kV}$ a 22°C , Vazão da bomba: $40\mu\text{L min}^{-1}$, $\text{Ar} = 0,95\text{ L min}^{-1}$. 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; 5. AsB: $50\mu\text{g L}^{-1}$.

6.3. Validação de metodologias analíticas

6.3.1. Separação e quantificação de espécies de arsênio por CE-ICPMS

Após otimização dos parâmetros de separação e medição, foram determinadas as características de desempenho da metodologia para cada espécie de arsênio: tempos de migração das espécies, curvas analíticas, concentração mínima detectável, e repetitividades. Não foi possível determinar a exatidão dos resultados para as diferentes espécies por falta de adequados materiais de referência certificados (MRC) em nosso laboratório.

Foram determinados os desvios padrão relativos (DPR) para os tempos de migração a partir de injeções repetidas ($n = 8$) de uma solução aquosa contendo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinco espécies de arsênio: (As(III), As(V), MMA(V), DMA(V) e AsB), como mostra a Tabela 7. Considerando a complexidade do sistema hifenado, CE-ICPMS, as repetitividades em torno de 5%, ou menor, devem ser considerados como altamente satisfatórias.

Tabela 7: Tempo de migração e seu desvio padrão relativo (DPR) para diferentes espécies de As separadas e determinadas pela metodologia proposta ($n = 8$).

Espécie	Tempo de migração (s)	DPR (%)
As(V)	254	4,7
MMA(V)	301	5,2
DMA(V)	331	6,2
AS(III)	466	2,9
AsB	515	2,8

A integração da área dos picos foi escolhida para a quantificação das espécies de arsênio, pois apresentou desvios padrão relativos inferiores à das alturas dos picos (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação entre os desvios padrão relativos (DPR) na quantificação dos picos eletroforéticos por dois métodos diferentes (n = 8).

Espécie	DPR – Área (%)	DPR – Altura (%)
As(V)	9,3	13,9
MMA(V)	5,2	16,5
DMA(V)	9,5	13,2
AS(III)	6,7	12,2
AsB	8,4	11,0

Verificou-se que o íon iodeto adicionado aos padrões para servir como pico de referência, não apresentou melhora em relação ao desvio padrão relativo dos tempos de migração, área ou altura dos picos, pois não houve um padrão de comportamento único para todas as espécies de arsênio à medida que o pico do iodeto apresentava alguma variação (sensibilidade, posição no eletroferograma). Por esta razão, não foi utilizado como pico de referência para correção dos resultados. Por outro lado, a presença deste pico no eletroferograma se mostrou muito útil, pois indicava o bom funcionamento do sistema de separação e “alertava” para a chegada próxima da primeira espécie de arsênio (AsV).

As curvas analíticas foram construídas a partir de soluções padrão das espécies As(III), As(V), MMA(V), DMA(V) e AsB, apresentando uma boa linearidade dentro de uma faixa de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, como mostra a Figura 46. Observa-se uma relação linear entre concentração de cada espécie de arsênio e área quantificada do pico correspondente, obtendo-se um coeficiente de correlação (R^2) de no mínimo 0,992. A metodologia desenvolvida apresentou melhor sensibilidade para as espécies As(III) e DMA(V) e menor sensibilidade para AsB (Figura 46).

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração ou quantidade que pode ser detectada com razoável certeza utilizando um determinado procedimento analítico. O LD corresponde a um sinal que representa

a concentração de um analito ainda distinguível, estatisticamente, do sinal do branco. Normalmente, é determinado pela medida de 10 brancos de amostra independentes, mensurados um de cada vez. A equação utilizada para calculá-lo é: $LD = 3_{sb}/S$, onde S_b = desvio padrão dos 10 brancos e S é a sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular).

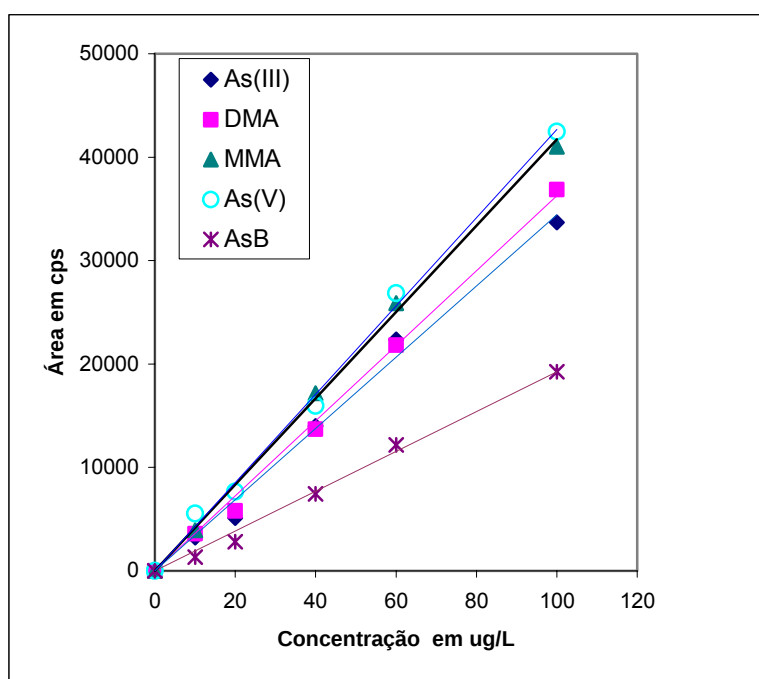


Figura 46: Curvas analíticas de cinco espécies de arsênio determinados por CE-ICPMS [1: As(III), $R^2 = 0,992$; 2: DMA, $R^2 = 0,997$; 3: MMA, $R^2 = 0,999$; 4: As(V), $R^2 = 0,996$; 5: AsB, $R^2 = 0,993$].

Neste trabalho, o limite de detecção não foi calculado utilizando-se a fórmula citada acima, pois em técnicas cromatográficas é comum que o LD seja definido empiricamente através da visualização da menor concentração do analito que possa ser distinguida da linha do fundo, uma vez que é mais difícil calcular o desvio padrão da linha base abaixo do pico. Na eletroforese capilar, o limite de detecção depende (entre outros parâmetros) do tempo de injeção, pois este deve ser escolhido como o tempo máximo de injeção em que se consegue ainda manter a estabilidade da corrente elétrica. Desta forma, uma solução contendo as cinco espécies de arsênio foi preparada numa concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ cada e, a partir desta solução, foram feitas diluições sequenciais até que não fosse possível diferenciar os picos das espécies em relação ao fundo utilizando-se um tempo de

injeção de 40 s. O LD foi estimado como $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para As(III), As(V), MMA(V) e DMA(V) e de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AsB. A Figura 47 apresenta os eletroferogramas na região limite de visualização dos picos.

Comparando-se estes limites de detecção com os obtidos para arsênio pela técnica de FIA-HG-ICPMS (vide capítulo 6.3.2) observa-se, claramente, a melhor sensibilidade desta última técnica (CE-ICPMS: $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$; FIA-HG-ICPMS: $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$). Isso se deve ao pequeno volume de amostra injetada na coluna capilar em CE-ICPMS, por exemplo, 200 nL para uma tempo de injeção de 40 s a 50 mbar, comparado aos 250 μL utilizados em FIA-HG-ICPMS. Esta comparação evidencia que a CE com detector de ICPMS é apenas vantajoso como técnica de separação quando se necessita do seu alto poder de resolução e baixíssimo consumo de amostra.

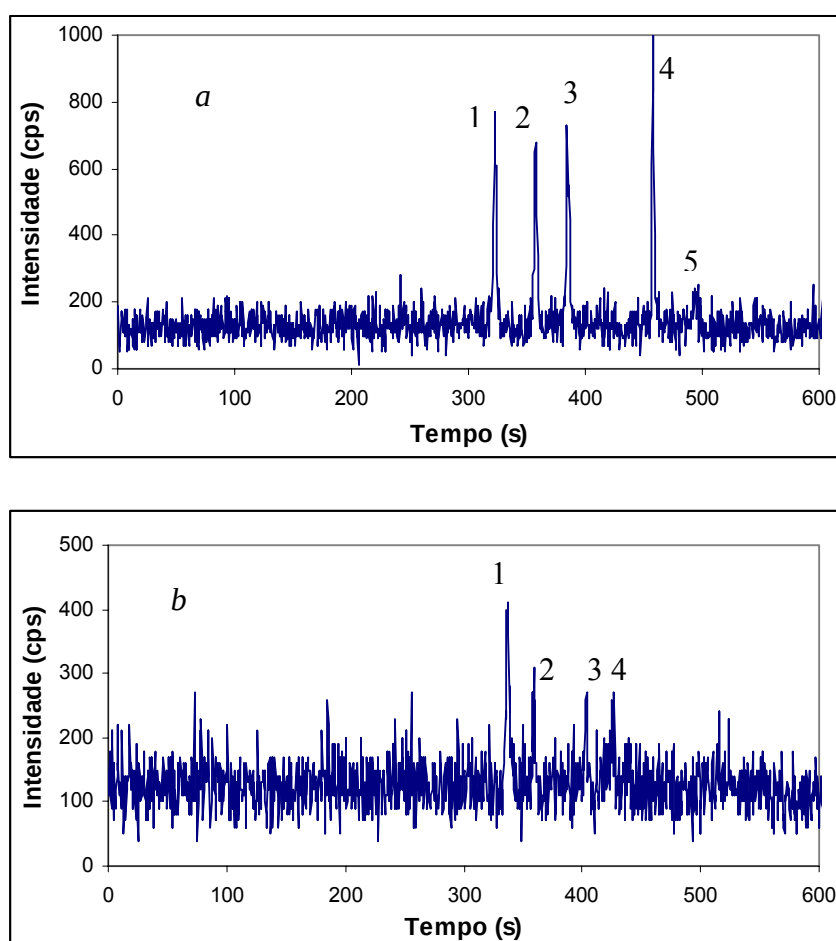


Figura 47: Visualização dos picos das espécies de arsênio na região limite. A) padrão de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ cada e b) padrão de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ cada. Picos: 1. As(V), 2. MMA(V), 3. DMA(V) e 4. As(III).

6.3.2. Quantificação de arsênio por FIA-HG-ICPMS

Esta técnica foi utilizada para quantificação de As-total em amostras de suco de uva, urina, sangue total e plasma, e para se obter informações adicionais sobre a especiação do arsênio (vide capítulos 5.6 e 6.4). Devido às altas concentrações de cloreto nestas amostras, a determinação direta do ^{75}As por ICPMS não seria possível, dada à interferência espectral causada pela espécie $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ ($m/z = 75$). A técnica de FIA-HG-ICPMS já está bem estabelecida no laboratório e foi adaptada da metodologia descrita por (Stroh *et al.*, 1993); por isso, apenas os resultados de validação serão apresentados aqui. A Figura 48 exemplifica sinais transientes obtidos por HG-ICPMS, e a Figura 49 mostra uma curva de calibração típica. Observa-se a perfeita linearidade entre os sinais e as concentrações ($R^2 = 0,999$). A partir de 10 medidas do “branco de reagentes” e a sensibilidade da curva analítica (S) foi calculado o limite de detecção ($3sB/S$) como sendo de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$.

A validação da metodologia de HG-ICPMS foi feita através da análise de três materiais de referência (vide p112) CASS-3, Seronorm-69101 (level 1) e Sernorm-69102 (level-2). A Tabela 8 resume os resultados obtidos e as concentrações certificadas dos respectivos MR com as suas incertezas reportadas.

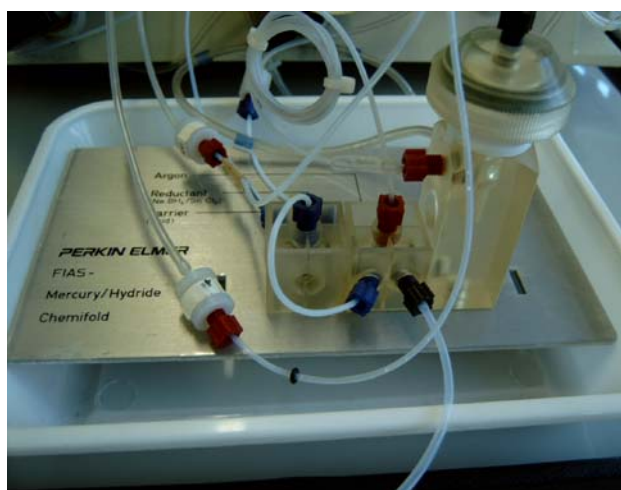
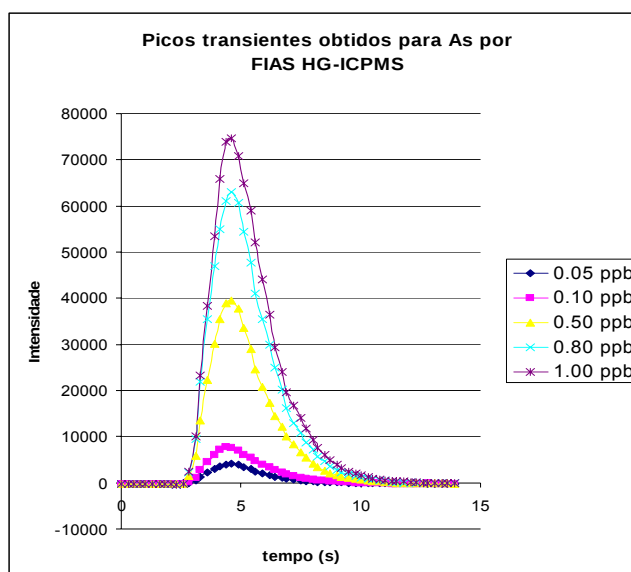


Figura 48: a) Exemplos Sinais transientes para As produzidos pelo sistema FIAS 200 acoplado ao ELAN 5000 ICPMS; b) *Chemifold* com separador de membrana utilizado neste trabalho.

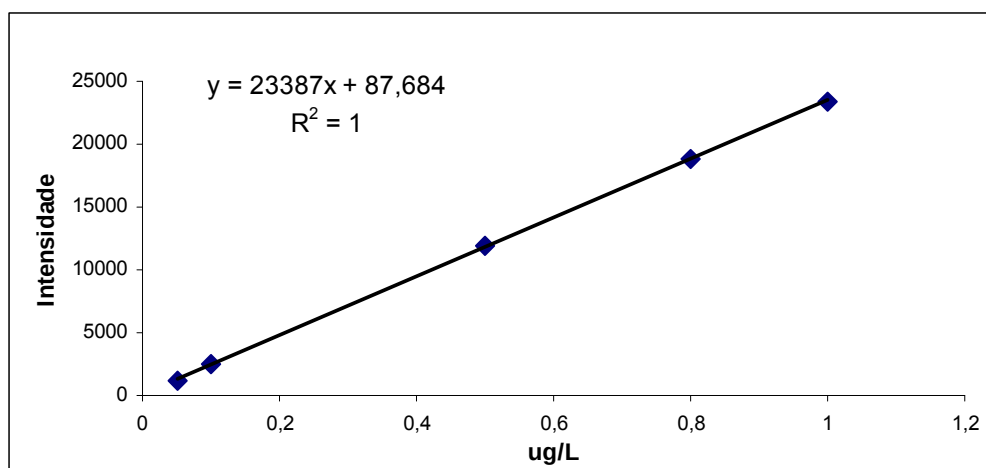


Figura 49: Curva de calibração típica para As obtida com o sistema FIAS 200 acoplado ao ELAN 5000 ICPMS. Alça de amostragem: 250 µL.

Tabela 9: Concentração média de arsênio (em µg L⁻¹) determinada em três materiais de referência por FIA-HG-ICPMS.

MRC	Valor certificado de As	Este trabalho
CASS-3	1,09 ± 0,07	1,16 ± 0,14 (n = 5; p = 0,05)
Seronorm-1	AAS: 61 (49 – 73) ICPMS: 64 (51 – 77)	49,5 ± 0,3 (n = 3)
Seronorm-2	AAS: 153 (123 – 184) ICPMS: 153 (122 – 183)	151,5 ± 1,7 (n = 3)

Observa-se uma boa concordância entre os resultados obtidos neste trabalho e os valores de referências, validando a metodologia aqui utilizada, chamando atenção, a elevada incerteza reportada pelo fabricante para as duas amostras da série Seronorm.

6.3.3.

Quantificação de As e outros elementos por ICPMS com calibração externa

Foi utilizada ainda a técnica de ICPMS com calibração externa para análise multielementar quantitativa de amostras de suco de uva e de pêlo da crina de cavalos. Estas análises, embora não diretamente necessárias para o objetivo principal desta tese (CE-ICPMS), tiveram por finalidade aproveitar as amostras para se obter informação complementar sobre a presença de outros elementos tóxicos e essenciais nelas contidos. Por se tratar de uma técnica bem estabelecida em nosso laboratório e já documentada em outras dissertações e teses, serão ilustradas apenas curvas analíticas típicas, coeficientes de determinação, limites de detecção expressos como BEC (concentrações equivalente ao branco) e resultados obtidos na análise das duas amostras de referência Seronorm 1 e 2, já comentadas anteriormente (Figura 50 e Tabelas 10 e 11)

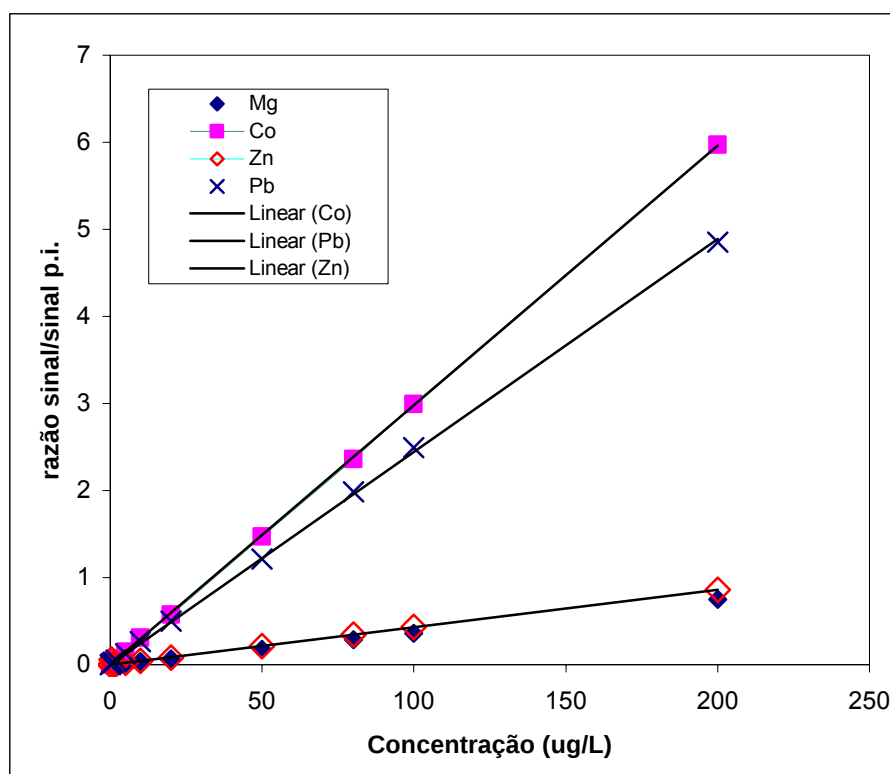


Figura 50: Exemplos de curvas de calibração para determinação quantitativa multielementar por ICPMS. Calibração externa com padronização dos sinais pelo ródio (Rh).

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.

Elementos	Coeficiente de determinação	BEC
	(R ²)	(mg L ⁻¹)
Al	0,9998	0,087
Ag	0,9999	0,0001
As	0,9995	0,002
Cd	0,9999	0,0001
Co	0,99998	0,0001
Cu	0,9998	0,002
Hg	0,9999	0,001
Pb	0,9999	0,0007
Mg	0,9997	0,008
Mn	0,9999	0,002
Ni	0,9999	0,001
Sb	0,9999	0,00001
Sn	0,9998	0,004
Se	0,9997	0,002
Tl	0,99987	0,0001
Zn	0,99996	0,02

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 $\mu\text{g L}^{-1}$.

	Serionorm Level 1 (69101)		Serionorm Level 2 (69102)	
	Referência	PUC-Rio	Referência	PUC-Rio
Al	39 (31 - 47) ¹ 29 (23 - 34) ²	37,4 ± 0,6	64 (51 - 77) ¹ 49 (37 - 60) ²	72,8 ± 4,5
Sb	n.r. 8,7 (6,9 - 10,4) ²	9,1 ± 0,3	n.r. 33,3 (26,7 - 40,0) ²	35,0 ± 1,0
Cd	9,6 (7,7 - 11,5) ¹ 9,2 (7,3 - 11,0) ²	8,7 ± 0,4	16,7 (13,4 - 20,1) ¹ 17,3 (13,9 - 20,8) ²	16,7 ± 0,3
Co	n.r. 7,5 (6,0 - 9,0) ²	7,5 ± 0,2	n.r. 20,8 (16,7-25,0) ²	21,1 ± 0,5
Cu	8 (6 - 10) ¹ 8 (7 - 10) ²	10,1 ± 0,2	57 (46 - 69) ¹ 51 (41 - 61) ²	53,9 ± 1,4
Pb	13,5 (10,8 - 16,2) ¹ 13,0 (10,4 - 15,6) ²	15,1 ± 0,7	68,3 (54,6 - 81,9) ¹ 64,3 (51,4 - 77,1) ²	77,2 ± 1,1
Mg	57,8 (46,3 - 69,4) ¹ n.r.	60,5 ± 0,6	231 (185 - 277) ¹ n.r.	217 ± 3
Mn	n.r. 7,4 (5,9 - 8,9) ²	9,7 ± 0,2	n.r. 15,8 (12,7 - 19,0) ²	23,9 ± 0,1
Ni	2,1 (1,7 - 2,5) ¹ n.r.	3,0 ± 0,1	24,1 (19,3 - 29,0) ¹ n.r.	24,0 ± 0,5
Tl	n.r. 8,5 (6,8 - 10,1) ²	10,8 ± 0,2	n.r. 161 (128 - 193) ²	204 ± 2
Zn	551 (441 - 662) ¹ 446 (356 - 535) ²	522 ± 1	1055 (844 - 1266) ¹ 875 (700 - 1050) ²	1015 ± 11

Abreviações: n.r.= não reportado; ¹ = determinado por AAS; ² = determinado por ICPMS

Dentro das incertezas reportadas, observa-se, em geral boa concordância entre as concentrações certificadas e as determinadas neste trabalho. Também nesta série de dados, chama atenção à diferença nos valores de referência de alguns elementos (Al, Zn) determinados por AAS e ICPMS, respectivamente. Comparando os resultados deste trabalho com os valores certificados por AAS e/ou ICPMS, observa-se, em geral, menor discrepância quando os resultados de AAS são considerados.

6.4. Aplicações

A metodologia desenvolvida para a especiação de arsênio foi aplicada em dois estudos de casos: (2) verificação de níveis de arsênio e de suas espécies em sucos de uva vendidos no Brasil, e (2) pesquisas sobre a absorção, excreção e biotransformação de uma droga veterinária contendo arsênio e utilizada no tratamento de cavalos. Devido às grandes dificuldades vivenciadas no desenvolvimento do acoplamento entre a eletroforese capilar e o ICPMS, não houve tempo hábil para se fazer um estudo mais aprofundado, tarefa reservada para a continuação deste trabalho. Pelo motivo exposto, os resultados aqui apresentados devem ser considerados ainda como preliminares.

6.4.1. Análise da amostras de suco de uva

6.4.1.1. Concentração de As-total e de alguns outros elementos

Foram determinados os teores de arsênio e de outros contaminantes inorgânicos em 31 amostras de 20 marcas diferentes de suco de uva, provenientes de oito estados brasileiros. Doze marcas de suco de uva integral foram analisadas para determinação de arsênio total por ICPMS, com geração de hidretos. Estas amostras foram filtradas com filtro 0,45 µm no dia da análise. A Tabela 12 apresenta os resultados do teor de arsênio e de alguns outros metais presentes no suco de uva.

Tabela 12: Determinação de contaminantes inorgânicos em suco de uva. (ND: não determinado; * Zn, Na e Cu em mg L⁻¹, restante em µg L⁻¹. Na e Cr foram determinados por ICP OES).

	As	Cd	Cu*	Cr	Hg	Na*	Ni	Pb	Sn	Zn*
Aurora	3,6	< 0,1	0,13	17,2	ND	29,0	3	1	ND	0,15
B. Ischia1	10,2	0,6	0,45	18	0,2	244	16	6,3	< 2	0,63
B. Ischia2	7,6	0,5	0,56	16	0,4	250	14	2,9	< 2	0,58
B. Ischia3	9,2	0,2	0,70	16	0,1	225	7,0	1,7	2,1	0,25
Big Fruit	4,3	3	0,45	15	0,1	344	19	4	2,9	0,78
C. Madeira	< 0,2	0,2	0,39	11,7	0,2	19,0	11,2	6,6	4,6	0,69
C. Bento	< 0,2	0,6	0,04	8,7	1,0	27,0	17	6	1,7	0,94
Curumat.1	ND	< 0,1	0,36	ND	< 0,1	ND	4,5	12	2	0,87
Curumat.2	2,4	< 0,1	1,03	34,9	< 0,1	280	28	7	< 2	0,64
D. Cândido	15,6	0,8	0,02	19,6	0,5	110	21	9,9	3,7	1,44
Imbiara1	ND	0,4	0,24	ND	0,3	ND	25,4	11,2	< 2	0,73
Imbiara2	< 0,2	1	0,46	12,1	< 0,1	23,5	16	2	< 2	0,48
Jandaia	2,2	< 0,1	0,18	26,1	ND	148	10	3	ND	0,48
Maguari1	10,6	0,7	0,55	18,1	0,1	148	20,5	2,4	< 2	0,71
Maguari2	10,4	0,7	0,92	20,9	0,4	139	16,4	2,8	< 2	0,88
Maguari3	9,3	0,7	0,80	45,9	0,4	148	16,5	2,9	< 2	0,84
Maravilha1	3,9	< 0,1	0,24	24,9	ND	325	22	3	ND	0,35
Maravilha2	2,6	0,4	0,14	10,7	0,6	320	13,4	6,1	< 2	0,38
Pergola	7,4	< 0,1	0,36	14,9	ND	55	6	2	ND	0,57
Pindorama	10,7	ND	0,08	41	ND	306	ND	10	ND	0,70
Rossoni1	11,1	ND	0,44	ND	ND	ND	ND	10,7	< 2	0,64
Rossoni2	8,2	< 0,1	1,26	18,1	< 0,1	95	14	7	< 2	0,59
Salton	4,2	0,6	0,82	12,3	0,6	31,0	24,3	16,5	4,4	0,85
Santal	10,6	0,2	0,72	15	0,1	230	5,2	1,4	2,2	0,30
Serigy	9,9	1	0,50	59,8	< 0,1	220	32	3	15	0,61
Sinuelo1	2,4	0,3	0,04	ND	ND	48	9,6	7,8	11	1,27
Sinuelo2	4,7	0,4	0,03	11,4	0,2	38	20	15,6	5,5	1,35
Superbom1	ND	< 0,1	0,14	ND	ND	ND	3	1	ND	0,19
Superbom2	< 0,2	0,3	1,28	16,4	ND	26,0	17,9	2,3	3,5	0,42
Uva S61	ND	< 0,1	0,21	ND	< 0,1	ND	19	8	5	0,67
Uva S62	< 0,2	< 0,1	0,34	10,9	< 0,1	26,5	12	10	7	0,59

Os “Limites Máximos de Tolerância” estabelecidos pela ANVISA para estes elementos em suco de fruta são apresentados na Tabela 13, juntamente com os valores correspondente da Comunidade Européia (EU) e da Índia.

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).

	BRASIL (mg/L)	UE (mg/kg)	ÍNDIA (mg/kg)
As	0,5	-	0,2
Cd	0,5	-	-
Cu	30	-	5,0
Cr	0,1	-	-
Hg	0,01	-	-
Ni	3	-	-
Pb	0,4	0,05	1
Sb	1	-	-
Se	0,05	-	-
Sn	250	-	250
Zn	25	-	5,0

Zinco e cobre e cromo são os elementos que apresentaram os maiores teores, com máximos de 1,44, 1,28 e 0,060 mg L⁻¹, respectivamente. Estes valores encontram-se, no entanto, bem abaixo dos “Limites Máximos de Tolerância” permitidos pelas normas brasileiras. Outros elementos, como o mercúrio, apresentam poucos resultados acima do limite de detecção. O teor médio de arsênio em suco de fruta obtido neste trabalho (7,1 µg kg⁻¹) é compatível com aquele encontrado em sucos de frutas na Alemanha (11,3 µg kg⁻¹), (BVL,1999). Também são similares aos teores de arsênio inorgânico encontrados por Schoof et al. em sucos de uva nos Estados Unidos (9,2 µg kg⁻¹). Estes pesquisadores, no entanto, afirmam que o teor de arsênio total seria bem mais alto (58,3 µg kg⁻¹), supostamente devido à presença de MMA e DMA. No presente estudo, não foram encontradas evidências da presença de compostos orgânicos de arsênio em suco de uva, como mostram os resultados a seguir.

6.4.1.2.**Especiação de arsênio em amostras de suco de uva**

A partir destes resultados foram feitas novas análises para a determinação de As(V) e As(III) por FIA-HG-ICPMS. Numa primeira etapa, a amostra foi analisada sem pré-redução, obtendo-se o valor referente ao As(III) na amostra. Numa segunda etapa, alíquotas da amostra foram pré-reduzidos, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, para determinação da concentração das duas espécies ($\text{As}^{\text{V}} + \text{As}^{\text{III}}$). O As(V) é calculado por diferença. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos na análise realizada em 24 amostras de 19 fabricantes. Comparando-se os valores de As-total determinados por este procedimento com os obtidos anteriormente após oxidação prévia da amostra com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (Tabela 12), observa-se, em geral, boa concordância entre aos valores. Isso confirma que nos sucos analisados não se encontram espécies orgânicas, tais como MMA e DMA, pois não iriam gerar hidreto sem oxidação prévia. Na presença destas espécies refratárias, dever-se-ia esperar concentrações mais altas deste elemento nas amostras oxidadas, o que não foi o caso neste trabalho.

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).

Marca do Suco	As-total *	As-total	As(III)	As(V)	As(V)/As(III)
Aurora	3,6	3,5	1,2	2,4	2,0
B. Ischia1	10,2	9,7	2,9	6,8	2,3
B. Ischia2	7,6	7,1	1,0	6,1	6,0
B. Ischia3	9,2	9,0	1,8	7,2	4,0
Big Fruit	4,3	4,3	2,8	1,4	0,5
C. Bento	<0,2	0,3	< 0,2	-	-
C. Madeira	<0,2	0,2	< 0,2	-	-
Curumat2	2,4	2,4	1,3	1,2	0,9
D. Candido	15,6	14,8	6,5	8,4	1,3
Imbiara2	<0,2	0,2	< 0,2	-	-
Jandaia	2,2	2,2	0,8	1,5	1,8
Maguary1	10,6	9,6	1,4	8,2	5,9
Maguary2	10,4	9,8	1,7	8,2	5,0
Maguary3	9,3	8,3	1,2	7,2	6,1
Maravilha1	3,9	3,5	2,4	1,2	0,5
Maravilha2	2,6	2,4	1,6	0,8	0,5
Pergola	7,4	6,6	0,8	5,8	7,6
Pindorama	10,7	10,5	6,6	3,9	0,6
Rossoni2	8,2	8,6	2,0	6,7	3,4
Salton	4,2	3,9	0,6	3,3	5,2
Santal	10,6	10,7	2,1	8,5	4,0
Serigy	9,9	9,9	5,5	4,4	0,8
Sinuelo2	4,7	4,4	1,3	3,1	2,4
Superbom2	<0,2	0,3	< 0,2	-	-

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).

Marca do Suco	Conservantes
Aurora	INS 202 e INS 220
Bela Ischia	INS 211 e 223
Big Fruit	INS 211 e 223
Casa da Madeira	não contém
Casa de Bento	não contém
Curumatan	INS 211 e 223
Dom Cândido	não contém
Imbiara	não contém
Jandaia	INS 211 e 223
Maguari	INS 211 e 223
Maravilha	INS 211 e 223
Pergola	INS 202, INS 211 e INS 220
Pindorama	INS 211 e 223
Rossoni	não contém
Salton	não contém
Santal	INS 211 e 223
Serigy	INS 211 e 223
Sinuelo	INS 202 e INS 211
Superbom	não contém
Uva Só	não contém

A Tabela 14 mostra que, para a maioria dos sucos analisados, o teor de As(V) é maior que o teor de As(III), tendo-se apenas em 6 amostras uma quantidade superior de As(III) em relação a As(V). Apesar de que em todos os sucos o teor de As-total está dentro do limite da ANVISA, a análise feita pode concluir que o estudo da especiação é importante para se ter o conhecimento das espécies presentes na amostra. Tendo em vista que As(III) é muito mais tóxico que As(V), deve-se levar em consideração quais os fatores que fizeram com que algumas amostras apresentassem um teor mais alto desta espécie. Apesar de não ser possível chegar a nenhuma conclusão definitiva, este fato pode ser devido à adição de algum aditivo em quantidade superior se comparado com as outras marcas. Verifica-se que as amostras que apresentam uma razão As(V)/As(III) menor que 1,0, também apresentam um teor de sódio muito acima da média,

mesmo levando-se em conta que, em média, as amostras contendo conservantes apresentam teores de sódio elevados. A explicação mais provável para este fenômeno é que nestas amostras foi adicionada uma quantidade elevada de um conservante com capacidade redutora, como por exemplo, o metabissulfito de sódio (INS223), causando um aumento na concentração de As(III). De acordo com esta interpretação, a concentração elevada de sódio seria um indício do uso exagerado de conservante.

A análise de especiação do arsênio por eletroforese capilar e ICPMS foi feita no suco de uva “Dom Cândido”, pois esta amostra apresentou o maior teor de arsênio total (14,8 e 15,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). A amostra foi filtrada com filtro 0,45 μm e a separação eletroforética foi realizada utilizando-se as condições otimizadas. O tampão foi uma solução de fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB 1,5 mmol L^{-1} em pH = 9. O make up foi uma solução de NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % de metanol em pH = 9, aspirada a uma vazão de 40 $\mu\text{L min}^{-1}$. A Figura 51 apresenta o eletroferograma obtido na análise.

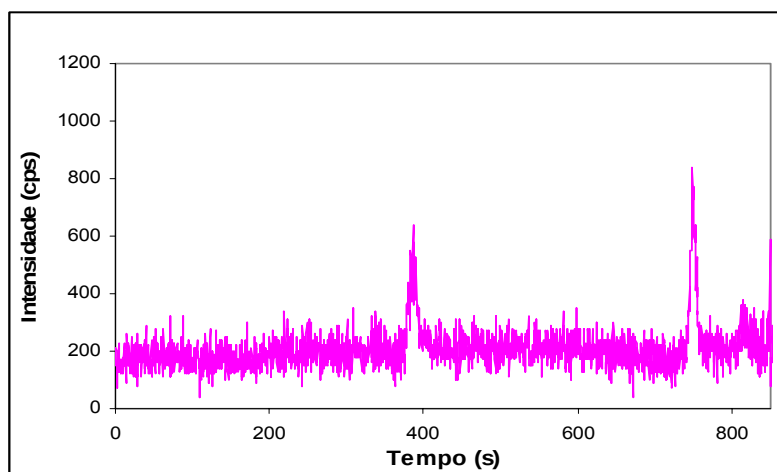


Figura 51: Especiação de arsênio por CE-ICPMS em uma amostra de suco de uva (Dom Cândido) com concentração total de As de cerca de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Injeção: 50 mbar/40 s, V = - 25 kV, Ar = 0,96 L min^{-1} .

Inicialmente, pensou-se que o primeiro pico fosse referente à espécie MMA(V), devido ao tempo de migração. No entanto, na eletroforese capilar a identificação dos picos não pode ser confirmada apenas pela comparação deste parâmetro, pois existem diversas causas que podem provocar a mudança no tempo

de migração dos compostos, como por exemplo, o tempo de injeção da amostra. Neste caso, a amostra foi injetada por 40 s, pois em tempos menores, os picos estavam muito pequenos, o que faz com que os compostos tenham um tempo de migração maior do que os já apresentados anteriormente. Desta forma, a confirmação dos picos foi feita através da adição de padrões (spikes). Em diferentes alíquotas do suco de uva foi feita adição das espécies As(V), MMA(V), As(III) e AsB em quantidade suficiente para que a concentração final destas espécies fosse de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A confirmação dos picos pode ser vista na Figura 52, que mostra o aumento acentuado da altura do primeiro pico quando da adição de As(V) e o aumento da altura do segundo pico quando a adição de As(III), confirmando assim a identidade das espécies.

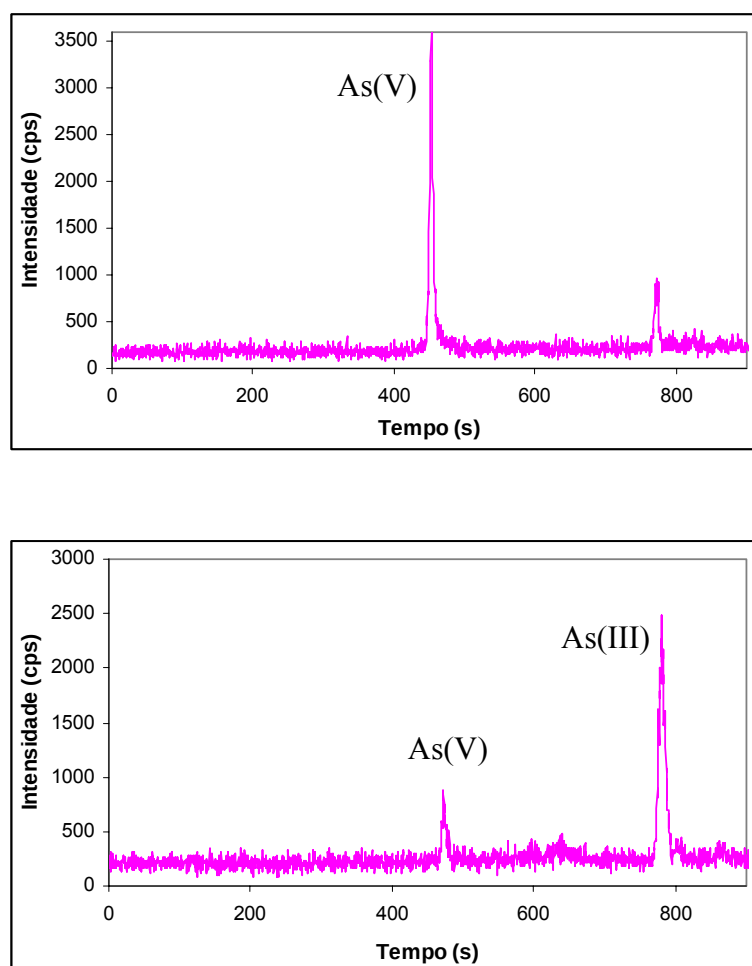


Figura 52: Identificação dos picos em suco de uva (vide Figura 51) pela adição de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(V) e As(III), respectivamente.

A análise por CE-ICPMS confirmou a presença de apenas As(III) e As(V) nas amostras dos sucos de uva e foi coerente com o resultado obtido por HG-ICPMS. No entanto, pela análise por CE-ICPMS, a integração das áreas dos picos mostrou um pequeno aumento de As(III) em relação a As(V), dando uma proporção entre As(V)/As(III) de 0,9, ao contrário do resultado obtido por HG-ICPMS que foi de 1,3. Atribui-se esta diferença à incerteza elevada na integração dos picos de tão baixa intensidade.

De acordo com Uthus (1994), os seres humanos necessitam entre 12 e 25 μg de arsênio por dia, tomando como referência uma dieta de 2.000 kcal. Por outro lado, a ingestão diária de quantidades iguais ou superiores a 600 μg de Arsênio inorgânico apresenta efeitos nocivos (Chappell, 1997). O limite seguro para a ingestão de arsênio ainda é objeto de ampla discussão. Mesmo assim, parece evidente que os teores de arsênio encontrados no suco de uva, com a concentração média de 7,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, tornam este alimento uma fonte segura de arsênio, de modo a fornecer este elemento nos níveis em que é considerado essencial para o organismo. O fato de parte de arsênio estar na forma de As(III), que é mais tóxico, não deve afetar significativamente este resultado.

6.4.2.

Análise do sangue, plasma, urina e pelo de crina em cavalos tratados com MMA (Arsenil®)

Como já mencionado anteriormente, foi feito um estudo piloto visando a implementação de uma metodologia para o exame *antidoping* para arsênio em cavalos de corrida, ainda inexistente no Laboratório do Jockey Clube do Brasil (Rio de Janeiro). Foram escolhidos 10 cavalos da “escola de equitação” deste clube para o estudo preliminar. Antes da aplicação da droga (0,27 g/dia de arsênio na forma de dose única de MMA(V) (Arsenil®) durante cinco dias seguidos), amostras de sangue, urina e pêlo da crina (cortado rente ao couro), foram coletados para determinação das concentrações basais de arsênio (e de outros elementos nas amostras de pêlo). Deste grupo de 10 cavalos, foram escolhidos apenas três para o estudo inicial com a droga. A seguir, serão reportados resultados referentes às concentrações totais dos elementos determinados, às espécies de arsênio encontrados, e observações, ainda preliminares, sobre a cinética de excreção de MMA(V). Os protocolos de amostragem e das diferentes técnicas analíticas utilizadas já foram mencionados nos capítulos 5.5 e 5.6.

6.4.2.1.

Concentração total de arsênio e de alguns outros elementos em amostras de crina de cavalo

A Tabela 16 resume os valores médios de concentração e outros parâmetros estatísticos para arsênio em amostras de pêlo de crina de cavalos, antes e depois do tratamento com Arsenil®. Observa-se uma concentração basal entre 0,03 e 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ a partir dos 10 cavalos examinados e um pequeno, mas nítido aumento nas amostras recolhidas dos três cavalos que receberam a droga, mostrado melhor na Figura 53. Isso confirma que, apesar da curta duração da ingestão de As na forma de MMA(V), o pêlo dos animais é capaz de registrar o evento, fato que pode ser utilizado para uma análise retrospectiva da aplicação da droga. Não se encontrou informações sobre a taxa de crescimento do pêlo de crina. Considerando que possa ser semelhante ao crescimento de cabelo do couro cabeludo em humanos (cerca de 1 cm por mês), a Figura 53 indica que a transferência da droga para o pêlo se manifesta de forma rápida (1 - 2 meses).

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.

Nome de cavalo	antes	<i>Depois do tratamento</i>		
		1 cm	2 cm	3 cm
Black Bits (Bl)	0,04	0,09	0,10	0,13
Cath Talescoen (Cta)	0,04	0,08	0,17	0,24
Chaca (Ch)	0,03	0,12	0,18	0,03
<i>Grupo sem aplicação de Arsenil®</i>				
Campanario	0,05	0,02	0,03	0,02
Cath Trilho	0,03	0,02	0,02	0,01
Detetive	0,04	...		
Doc Pastorean	0,03	0,02	0,01	0,01
Hillie	0,04	0,03	0,03	0,03
Shadow Badger	0,05	0,05	0,07	0,07
Umbra Real	0,03	...		
Média	0,04	0,03	0,03	0,03
Mediana	0,04	0,020	0,030	0,020
max-min	0,05-0,03	0,05-0,02	0,07-0,01	0,07-0,01

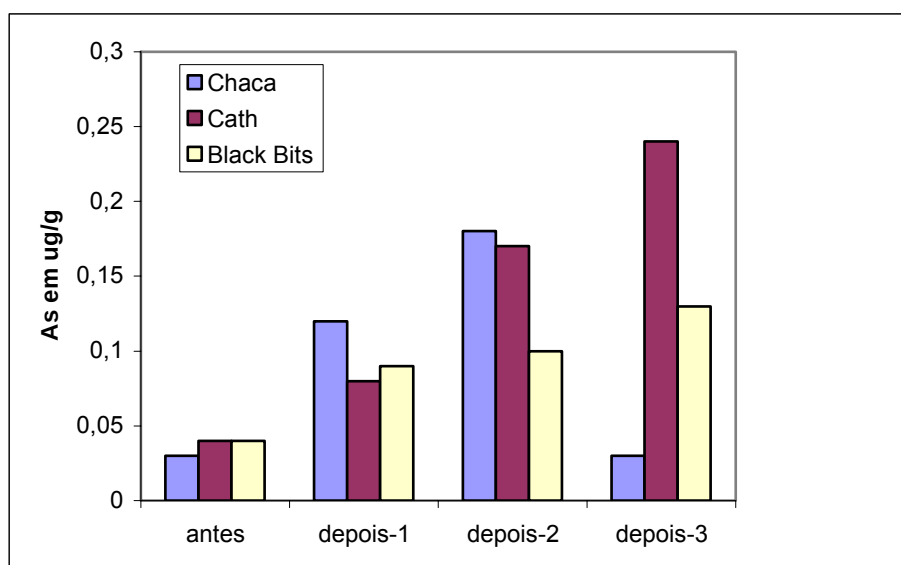


Figura 53: Teores de arsênio em amostras de pêlo de crina dos três cavalos antes e depois do tratamento com Arsenil®.

Além do arsênio, foram determinados nestas amostras de crina ainda outros elementos tóxicos e essenciais, dentro de uma rotina do laboratório que visa caracterizar a composição “mineral” do cabelo e estudar possíveis correlações entre anomalias encontradas e patologias clínicas (p.ex. Miekeley *et al.*, 2001). Embora não sendo diretamente relacionados com o objetivo principal da tese, os resultados merecem um pequeno comentário. A Tabela 17 exemplifica o resultado de uma análise multielementar (mineralograma) de uma amostra da crina do cavalo (Chaca), e a Tabela 18 resume dados de referência elaborados para uma população (homens e mulheres) residente na cidade do Rio de Janeiro (Carneiro *et al.*, 2002).

Uma comparação dos resultados mostra que, em geral, cavalos apresentam concentrações consideravelmente menores de elementos tóxicos no pêlo que humanos (p.ex. Al, As, Ba, Cd, Hg, Pb, Sn). Isso parece indicar que o tipo de alimentação é um fator preponderante na incorporação de metais tóxicos, uma vez que em vegetarianos humanos também foram encontrados níveis tão baixos como aqui observados em cavalos (Miekeley, 2006). Entre os elementos ditos “nutrientes” também existem diferenças marcantes (p.ex. Mo), mas não serão discutidos neste contexto.

Tabela 17: Composição inorgânica (mineralograma) de uma amostra de pêlo de crina do cavalo *Chaca* (Jóquei Clube do Brasil, Rio de Janeiro), mostrando baixas concentrações de elementos tóxicos quando comparadas com cabelo humano (vide Tabela 17).

	DEPARTAMENTO DE QUÍMICA (PUC-Rio)			
	LABORATÓRIO de ICP-MS e ICP-OES Rua Marquês de São Vicente, 225 - Gávea - Rio de Janeiro - RJ - 22451-900 Prédio Cardeal Leme - Sala 472 - Tel: (0xx21) 3527-1327 - Fax: (0xx21) 3527-1637			
Rio de Janeiro, 18/7/2006				
Cavalo: Chaca	Sexo: F		Código Interno: c-0577-06	
Local de Amostragem: crina			Idade:	
Médico:				
Clínica:				
<u>Resultados em: ug/g ou ppm</u>				
<u>Elementos Tóxicos:</u>				
Al: 1,6	Pb: 0,1	Sb: 0,002	Ag: < 0,01	
Bi: < 0,001	U: < 0,001	Ni: 0,05	Ba: 0,32	
Hg: < 0,05	Sn: < 0,05	Be: < 0,05	Th: < 0,001	
As: 0,03	Cd: < 0,01			
<u>Elementos Nutrientes:</u>				
Li: < 0,05	Mg: 257,8	Cr: 0,58	V: 0,022	
Se: 1,2	P: 559	Na: 8	Sr: 2,86	
Cu: 6,5	Mn: 0,54	B: 0,7	I: 0,58	
K: 8,1	Fe: 14,9	Co: 0,005	Mo: 0,130	
S: 32263	Cl: < 2	Ca: 1348	Zn: 159	
<u>Outros Elementos:</u>				
Au: < 0,005	Pd: < 0,005	Ge: < 0,03		
Método utilizado: Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (ICP-MS).				

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 *Carneiro et al., 2002*.

 DEPARTAMENTO DE QUÍMICA (PUC-Rio) LABORATÓRIO de ICP-MS e ICP-OES Rua Marquês de São Vicente, 225 - Gávea - Rio de Janeiro - RJ - 22451-900 Prédio Cardeal Leme - Sala 472 - Tel: (0xx21) 3527-1327 - Fax: (0xx21) 3527-1637 Rio de Janeiro,		
Amostra: cabelo humano (dados de referência) Local de Amostragem: cabeça Sexo: F + M Médico: Clínica:		Código Interno: Idade: > 25 a
<u>Resultados em: ug/g ou ppm</u>		
<u>Elementos Tóxicos:</u>		
Al: <14	Pb: <9,3	Sb: <0,03
Bi: <0,03	U: <0,02	Ni: <0,6
Hg: <2,3	Sn: <0,35	Be: n.d.
As: <0,15	Cd: <0,30	Ag: <0,40
		Ba: <4,0
		Th: <0,005
<u>Elementos Nutrientes:</u>		
Li: n.d.	Mg: 13-73	Cr: n.d.
Se: 0,8-1,5	P: 161-257	Na: n.d.
Cu: 10,0-32,0	Mn: 0,15-1,20	B: <0,30
K: n.d.	Fe: 7,0-18	Co: 0,003 - 0,03
S: 39965-46000	Cl: n.d.	Ca: 190 - 684
		V: 0,004 - 0,03
		Sr: 0,6-4,3
		I: 0,05-0,6
		Mo: 0,02-0,05
		Zn: 144-239
<u>Outros Elementos:</u>		
Au: 0,002-0,07	Pd: 0-0,01	Ge: 0-0,1
Observações: baseados no critério $1s$ (68%), distribuição log-normal Método utilizado: Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (ICP-MS).		

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®

As concentrações basais de arsênio em sangue (total) e plasma dos dez cavalos que participaram do estudo foram determinadas por FIA-HG-ICPMS e encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19: Concentrações médias de arsênio e outros parâmetros estatísticos para amostras de sangue e plasma dos cavalos que participaram neste estudo. Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Parâmetros estatísticos	Sangue total	Plasma
Média	0,44	0,46
Desvio padrão	0,03	0,02
Mediana	0,39	0,47
Número de amostra	n = 10	n = 10
Máx – min	0,90 - 0,19	0,54 - 0,35

Dos dez cavalos, apenas três (vide Tabela 15) foram submetidos ao tratamento com Arsenil® (MMA) durante cinco dias, seguindo-se o protocolo já mencionado anteriormente. Diariamente, e imediatamente antes da aplicação de uma nova dose da droga (sempre entre 8.00 e 9.00 horas de manhã), foram recolhidos cerca de 50 mL de sangue dos animais e logo levados para o Laboratório Anti-doping do Jockey Clube, onde alíquotas das amostras foram centrifugadas para se obter o plasma, e outras foram preservadas com Epinefrina® para posterior determinação de As no sangue (total). No primeiro dia, foram recolhidas também amostras após 6h e 12h depois da primeira aplicação de Arsenil®. Após os cinco dias de tratamento, a amostragem foi continuada por mais 5 a 7 dias. Infelizmente, a obtenção de urina durante toda fase do estudo se tornou um problema, pois ela foi possível em apenas um cavalo (Cath Talescoean).

A seguir, serão apresentadas as cinéticas de absorção e excreção de As-total dos três cavalos que participaram deste estudo (Figuras 54 e Figura 55).

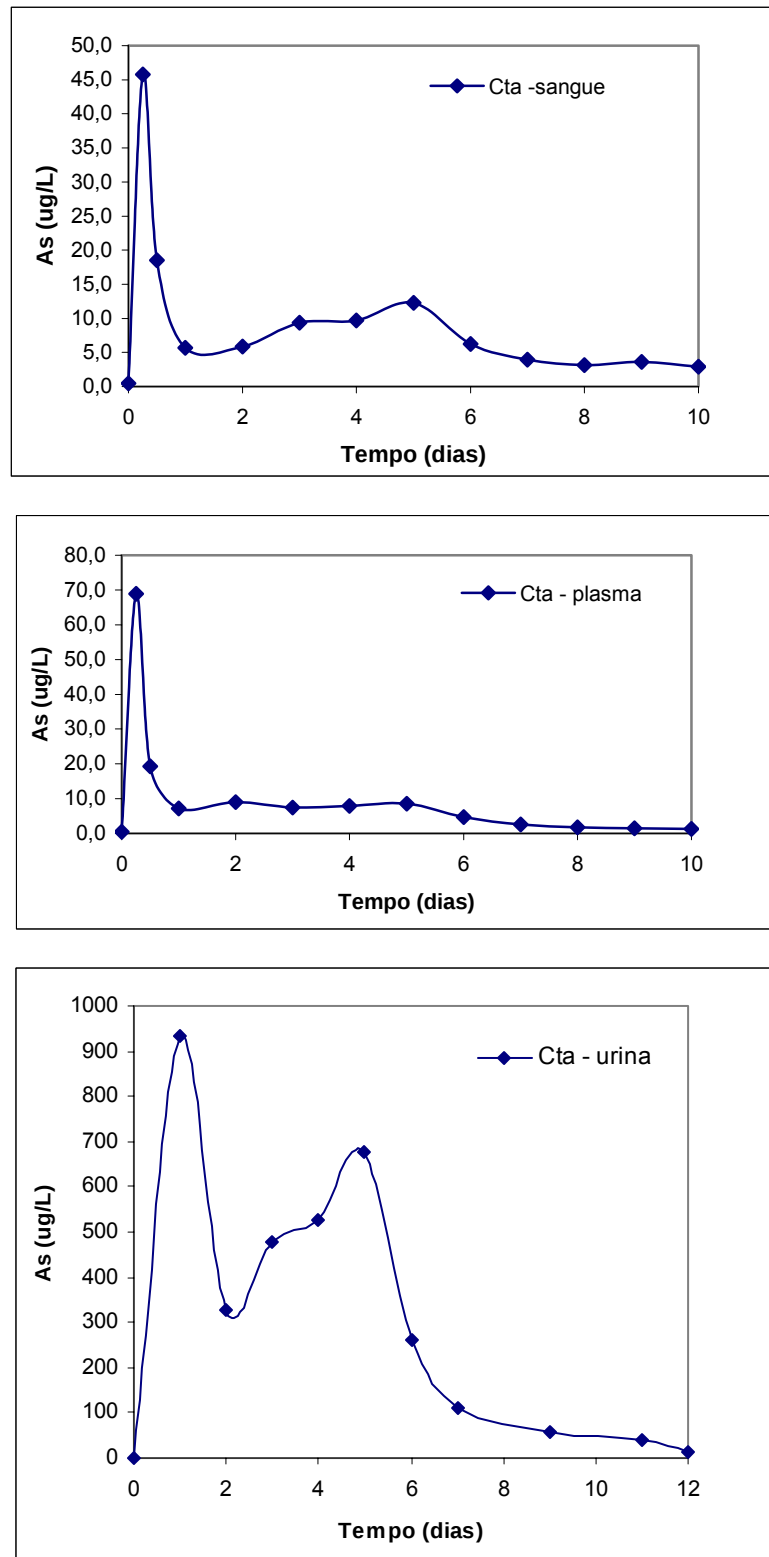


Figura 54: Cinética de absorção e excreção da droga Arsenil® monitorada através de amostras de sangue (total), plasma e urina do cavalo *Cath Talescoean* (Cta).

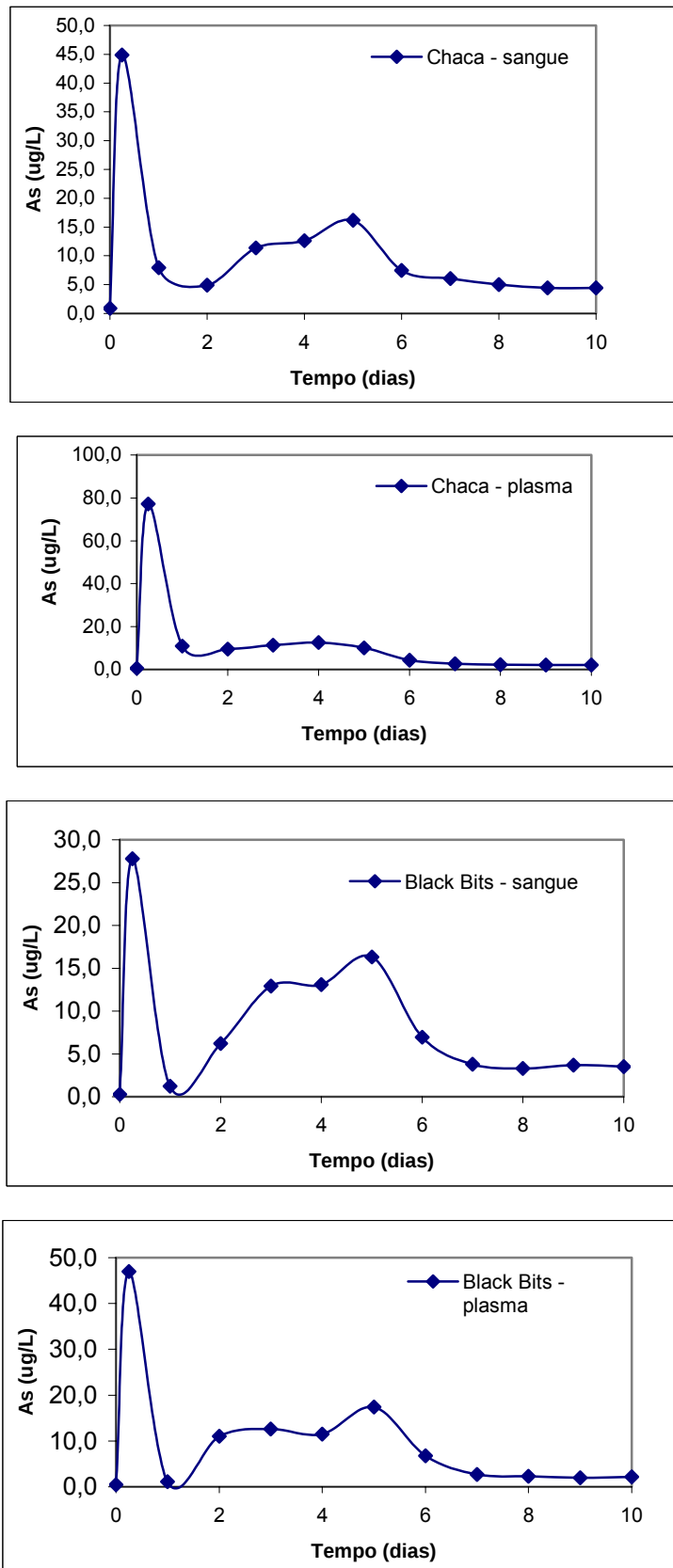


Figura 55: Cinética de absorção e excreção da droga Arsenil® monitorada através de amostras de sangue (total) e plasma em cavalos (*Chaca* e *Black Bits*).

Analisando os gráficos anteriores, verifica-se um padrão semelhante de absorção e excreção do arsênio nos três cavalos, tanto no sangue como no plasma. Após um rápido aumento dos níveis de As, medidos entre 6 e 12 horas depois da primeira aplicação, com concentrações de As no plasma entre, aproximadamente, 50 a 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, observa-se um fase de relativa constância de [As] durante os quatro dias seguintes à aplicação, sugerindo certo equilíbrio entre as taxas de absorção e excreção. Após a última aplicação da droga, no 5º dia, nota-se uma diminuição exponencial da concentração de arsênio em função do tempo, melhor visualizado na Figura 56, que será comentada posteriormente.

Verifica-se que a concentração de arsênio na urina é cerca de 10 vezes maior comparado com o sangue e plasma (Figura 54), comprovando que esta é a principal via metabólica de excreção do arsênio (Cornelis 2005). No entanto, em apenas dois dias depois do término da administração do medicamento, a concentração de arsênio apresenta um valor inferior a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, que é o limite máximo permitido pela “Federação Internacional de Autoridades em Corridas de Cavalo” (IFHA, 2005). A Figura 54 (urina) mostra maiores variações na concentração de As durante a fase de tratamento do que o observado para plasma e sangue total. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que a diluição da urina em função da ingestão de água pelo cavalo é altamente variável. Uma normalização dos dados pelo teor de creatinina está em andamento como tentativa para corrigir este efeito.

Observa-se também, que a concentração de As no plasma é cerca duas vezes maior que no sangue total correspondente, indicando que o As na forma de MMA(V) tem pouca afinidade pelas hemácias e, por esta razão, a presença delas no sangue-total reduz a fração mássica do plasma (soro) onde a droga está preferencialmente concentrada.

A Figura 56 mostra, em escala ampliada, a fase de eliminação de MMA(V) do plasma (blood clearing) e a excreção pela urina, num intervalo de tempo após a última aplicação da droga no 5º dia. Infelizmente, só foi possível ter amostras simultâneas de sangue e urina de um único cavalo (Cath Talescoean). Observa-se nas duas matrizes uma cinética de excreção semelhante, que se aproxima, durante o intervalo de tempo observado, de um modelo exponencial de primeira ordem, como mostra a Figura 56, com tempos de meia vida para excreção de MMA(V) de 34,3 h (1,43 d) e 43,7 h (1,82 d) via urina e plasma, respectivamente.

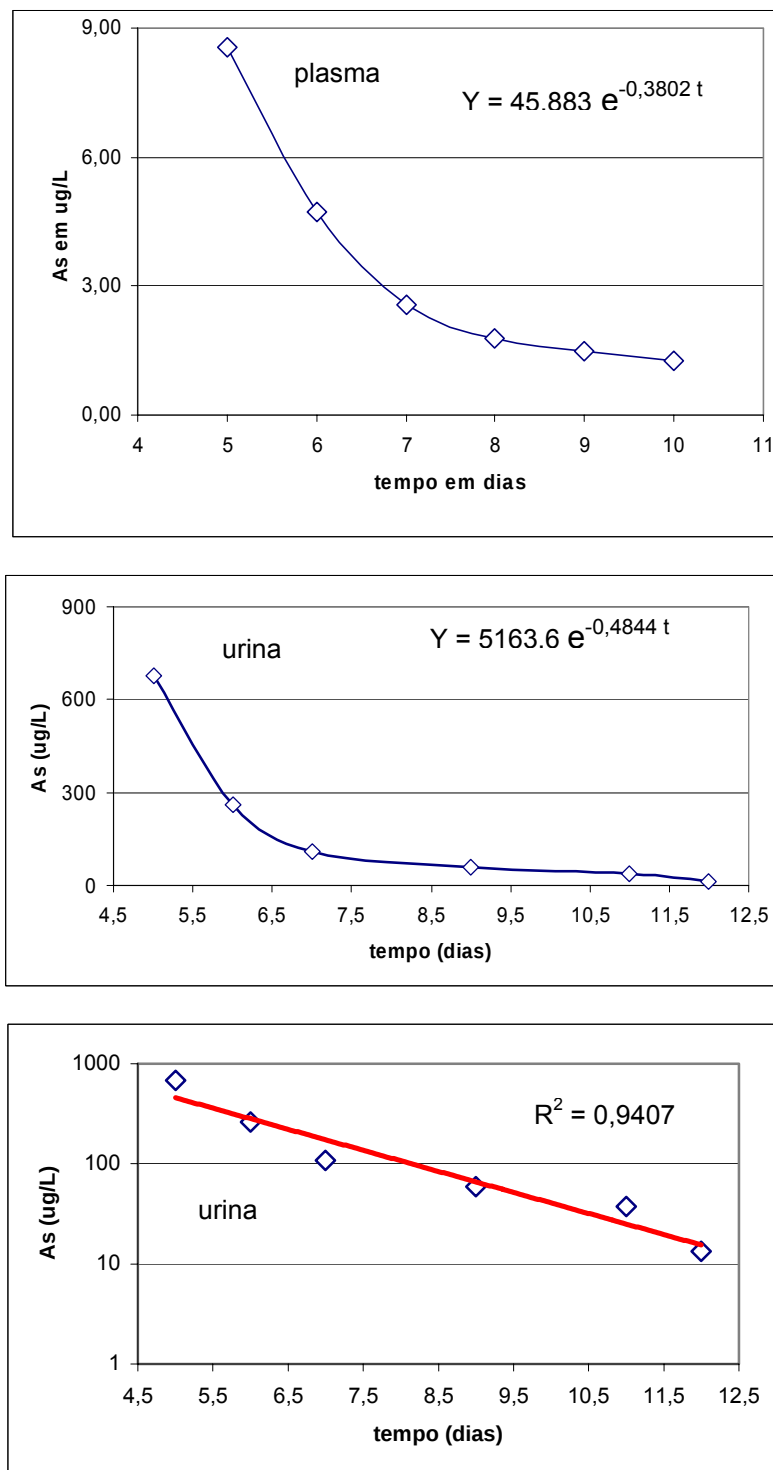


Figura 56: Cinéticas de excreção de Arsenil® (MMA^V) medidas através da determinação de As em amostras de plasma e urina do cavalo *Cath Talescoean*. Para o intervalo de tempo estudado, os resultados sugerem uma cinética de primeira ordem.

Este estudo terá continuação para se ter mais resultados disponíveis, visando à confirmação do modelo cinético proposto, e dos tempos de meia vida para a excreção da droga. Ambas as informações possuem relevância não apenas para o planejamento de monitoração da droga em testes antidoping, mas também, para avaliação de dosagem deste medicamento no tratamento veterinário de cavalos.

6.4.2.3.

Análise de especiação de arsênio em amostras de urina

Como foi mostrada no capítulo anterior, a principal via metabólica de excreção de Arsenil® é através da urina. Para verificar se a droga é eliminada na sua forma original (MMA^{V}) e/ou através de metabólitos, amostras de urina foram submetidas à análise de especiação por CE-ICPMS.

Inicialmente, foi analisada a própria droga para verificar a sua pureza em relação a outros componentes eventualmente presentes. A Figura 57 mostra o eletroferograma obtido na análise do medicamento que foi diluído para uma concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, filtrado e degaseificado.

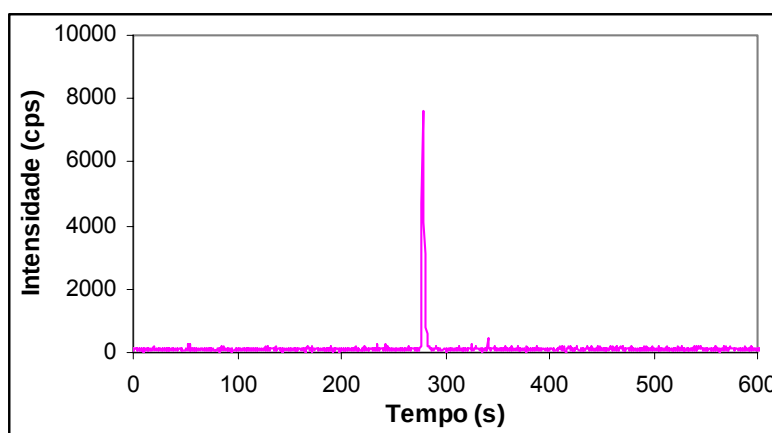


Figura 57: Eletroferograma do Arsenil® ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$). Tampão: fosfato 20 mmol L^{-1} + TTAB $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 9. *Make up*: NH_4NO_3 20 mmol L^{-1} + Cs $\mu\text{g L}^{-1}$ + 10 % metanol. $I = 50 \text{ mbar/5 s}$. $V = -25 \text{ kV}$. $\text{Ar} = 0,88 \text{ L min}^{-1}$. Vazão do *make up*: $40 \mu\text{L min}^{-1}$.

A presença de um único pico, identificado como $\text{MMA}(\text{V})$, confirma a pureza da droga, mostrando que a única espécie detectável é o monometilarsinato de sódio, indicado na bula como princípio ativo. O eletroferograma da urina no 5º dia da administração do medicamento é apresentado na Figura 58.

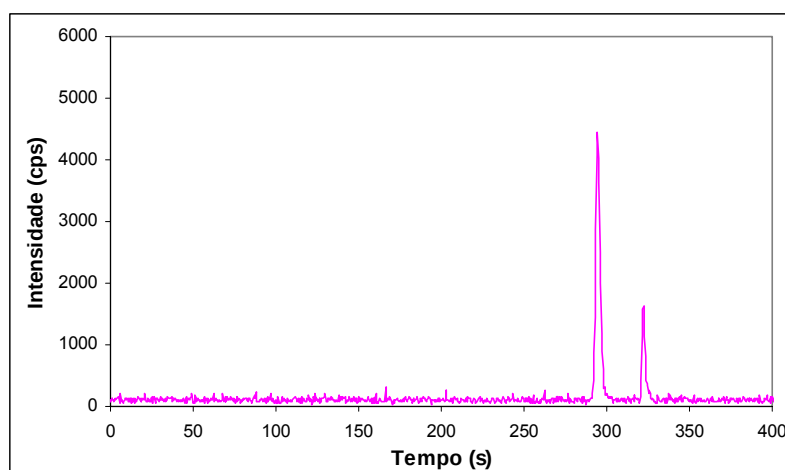


Figura 58: Eletroferograma obtido por CE-ICPMS da urina (1:5) do cavalo Cta no 5º dia da administração do medicamento Arsenil®. Tampão: fosfato 20 mmol L⁻¹ + TTAB 1,5 mmol L⁻¹, pH = 9. *Make up*: NH₄NO₃ 20 mmol L⁻¹ + Cs µg L⁻¹ + 10 % methanol. I = 50 mbar/5 s. V = -25 kV. Ar = 0,88 L min⁻¹. Vazão do *make up*: 40 µL min⁻¹.

Comparando os dois eletroferogramas, conclui-se que o primeiro pico representa a espécie MMA(V) enquanto que o segundo pico é o DMA(V), identificado a partir da adição de 50 µg L⁻¹ de DMAV, como mostra a Figura 59.

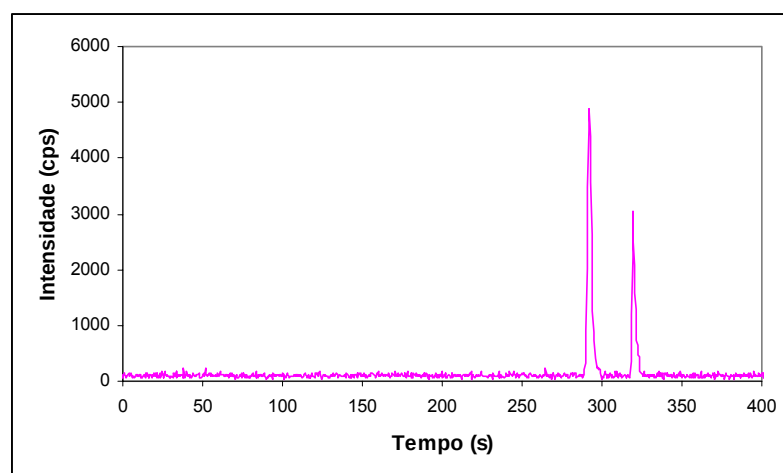


Figura 59: Eletroferograma mostrando a identificação do pico DMA(V) através da adição de um spike (50 µg L⁻¹) na urina do cavalo Cta no 5º dia da administração do medicamento Arsenil®. Condições experimentais semelhantes à Figura anterior.

Para verificar se a presença do DMA(V) na urina é resultado de um processo de transformação metabólica *in vivo* do MMA(V), já observado em

outros estudos (Tseng, 2005) ou simplesmente uma alteração in vitro da droga dentro da matriz de urina, estudos de estabilidade com Arsenil® foram feitos.

Inicialmente, foi feita uma análise de uma amostra de urina do cavalo, anteriormente à administração do medicamento, verificando-se a ausência de picos de arsênio. Em seguida, a amostra foi fortificada com Arsenil® ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) e mantido em geladeira, tal como todas as outras amostras utilizadas nos estudos de especificação. A Figuras 60 apresenta os eletroferogramas obtidos pela análise da urina do cavalo logo após a fortificação, 7 dias e 22 dias depois.

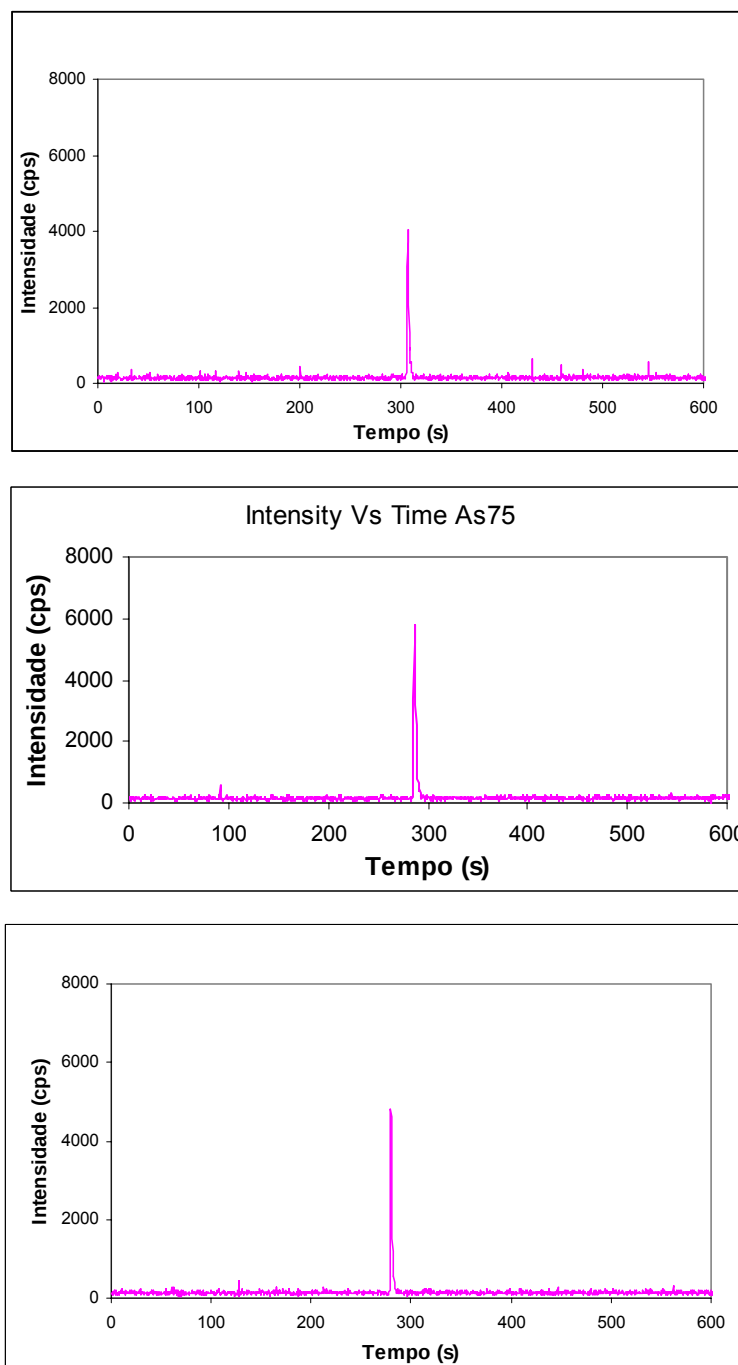


Figura 60: Eletroferograma obtido imediatamente após a fortificação da urina com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Arsenil®, sete dias e vinte e dois dias depois. Urina do cavalo Cta; condições experimentais semelhantes às da Figura 58.

Os três eletroferogramas mostram que, no intervalo de tempo investigado, não há indícios da formação de DMA(V), sugerindo que a presença desta espécie durante o tratamento do cavalo com a droga é resultante de uma transformação metabólica.

Para avaliar, de forma quantitativa, a presença e transformação de MMA(V) na urina, foram construídas curvas de calibração para as duas espécies, MMA(V) e DMA(V), numa faixa de 10 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9985 e 0,9987, respectivamente. Estas curvas foram usadas para quantificação das duas espécies nas amostras de urina do cavalo CTa num período de 9 dias (5 d durante administração do medicamento, 4 d depois). A Tabela 20 apresenta a concentração das espécies em cada urina e a Figura 61 a curva de excreção/transformação das espécies ao longo dos dias.

Tabela 20: Concentração (em $\mu\text{g L}^{-1}$) das espécies MMA(V) e DMA(V) em amostras de urina do cavalo Cta.

Dias	MMA		DMA	
	Média	DPR (%)	Média	DPR (%)
1	1265	5,3	75,2	15
2	438	4,5	41,4	8,2
3	740	8,3	158	7,2
4	988	5,5	162	12
5	1154	8,8	226	6,4
6	281	1,5	184	4,5
7	69,9	8,2	130	4,9
9	30,0	7,9	88	6,7

Tabela 21: Comparação dos resultados de As em urina obtidos por dois métodos independentes (CE-ICPMS e FIA-HG-ICPMS). ND = não determinado.

Dias	Arsênio ($\mu\text{g/L}$)		Desvio (%)
	CE-ICPMS	FIA-HG-ICPMS	
0	ND	2,15	ND
1	718	934	77
2	257	326	79
3	482	476	101
4	617	527	117
5	741	678	109
6	151	261	75
7	108	108	100
9	80,6	59,2	136

Usando-se os respectivos fatores estequiométricos, calculou-se o teor de arsênio total em cada amostra de urina e compararam-se os valores com os obtidos por FIA-HG-ICPMS, numa fase anterior do trabalho (Tabela 21 e Figura 54).

Considerando-se que a confiabilidade das concentrações de As-total determinadas por FIA-HG-ICPMS é maior (melhores limites de detecção, técnica mais robusta e menos complexa) foram calculados rendimentos de recuperação (%) baseados nos valores de FI-HG-ICPMS (por definição 100%), como mostra a Tabela 20. Obteve-se razoável concordância entre os valores, mostrando que a técnica de especiação, aperfeiçoada no âmbito deste trabalho, fornece também resultados quantitativos para as espécies estudadas.

A Figura 61 apresenta os dados das Tabelas 20 e 21, numa forma mais informativa.

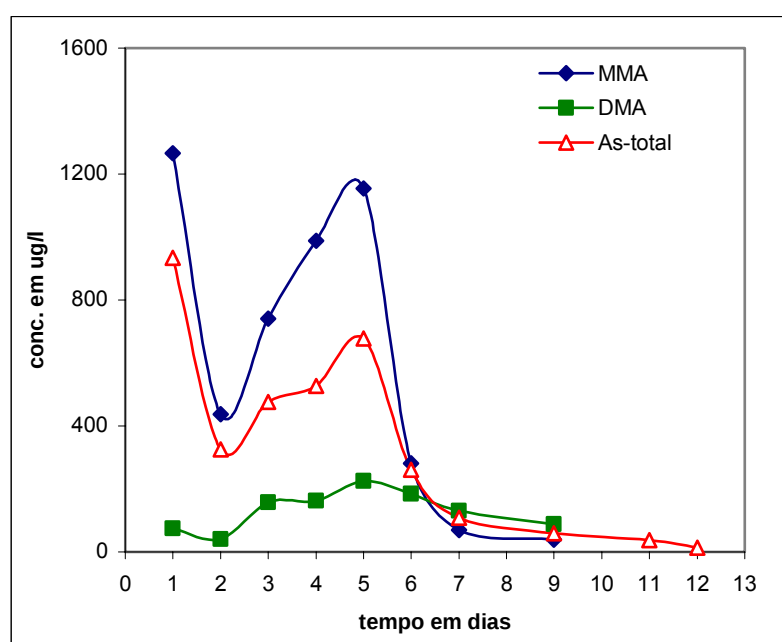


Figura 61: Curva de excreção de MMA(V), DMA(V) e As-total na urina do cavalo CTA. Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Observam-se tendências semelhantes nos perfis de incorporação, transformação e excreção das espécies estudadas, mostrando que os mesmos não são artefatos de problemas analíticos, visto que diferentes técnicas (FIA-HG-ICPMS para As-total, CE-ICPMS para MMAV e DMAV) forneceram tendências semelhantes. É interessante constatar que a formação e excreção da espécie DMA acompanha os perfis de concentração de MMA (e As-total), indicando que a transformação de MMA(V) em DMA(V) é uma resposta do organismo aos níveis elevados da espécie mais tóxica MMA, com já sugerido para outros sistemas biológicos (Tseng, 2005, Cornelis, 2005).