4
Materiais e métodos

A disponibilidade no Laboratório de ICPMS da PUC-Rio de um moderno cromatógrafo de íons, dotado com detectores condutimétrico e amperométrico, motivaram a opção pelo trabalho inicial de otimização do procedimento de separação com esta técnica, considerando também o baixo custo operacional do equipamento quando comparado ao ICPMS. Uma vez otimizadas as condições de separação, partiu-se então para o acoplamento (hifenação) com ICPMS visando uma melhor sensibilidade na detecção dos íons de interesse.

4.1
Otimização da separação das espécies inorgânicas de selênio através da técnica de cromatografia de íons

O cromatógrafo de íons utilizado na etapa de otimização, do fabricante Metrohm (Suiça), é do tipo modular e composto de: detector condutimétrico 732 IC, bomba cromatográfica 709 IC, módulo de supressão 753, detector amperométrico VA 802, amostrador automático 733 IC, unidade de bomba isocrática mod. 752 e interface 762 IC. O *software* para aquisição e tratamento de dados foi o IC net, versão 2.1. As colunas de troca aniônicas testadas para a realização deste estudo foram Metrosep A Supp1 e Metrosep A Supp 4, da Metrohm. Ambas as colunas possuem 250mm de comprimento, com diâmetro de 4,6mm e 4,0mm, respectivamente. O material de empacotamento da Metrosep A Supp1 é um copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, contendo amônio quartenário como sítio ativo, com partículas de 7 μm de diâmetro. O corpo da coluna é feito de PEEK. Essa coluna tolera eluentes fortemente alcalinos e com alto conteúdo de modificadores orgânicos.

A coluna Metrosep A Supp 4 tem como material de empacotamento gel de álcool polivinílico, contendo amônio quartenário como grupo trocador. As partículas têm 9 μm de diâmetro e o corpo da coluna é também feito de PEEK.

Foi testada ainda a coluna PRP-X100 (Hamilton, EUA) de 150mm de comprimento e 4,1mm de diâmetro. O material de empacotamento é poliestireno-divinilbenzeno, tendo o grupo trimetil amônio como grupo funcional. Esta coluna é confeccionada em aço inoxidável e as partículas têm 10 μm de diâmetro.

Durante as etapas de desenvolvimento, quando era utilizado o detector condutimétrico, optou-se pelo emprego de soluções livres de quaisquer outros íons estranhos, devido à falta de seletividade deste tipo de detector. Para tal, preparou-se soluções-estoque (1000 μg mL^{-1}) de selenito, selenato e selenocianato , a partir de reagentes de alta pureza sem a adição de algum material com função de conservação. Os sais utilizados foram: selenito de sódio (Na_2SeO_3), selenato de sódio decahidratado ($Na_2SeO_4.10H_2O$) e selenocianato de potássio (KSeCN), todos de grau *p.a.* e adquiridos da Sigma-Aldrich. Estas soluções não foram empregadas em procedimentos de calibração, sendo utilizadas apenas para otimizar a separação. Nesta fase do trabalho era usado o amostrador automático para fazer as injeções e foi utilizada uma alça de amostragem de 100 μL, confeccionada em poliéter-éter-cetona (PEEK). Todas as soluções nesta etapa do trabalho (e em todas as outras) foram preparadas com uso de água Milli-Q (>16 MΩcm).

O detector amperométrico foi empregado para investigar o comportamento de retenção da espécie selenocianato nas colunas cromatográficas utilizadas. Infelizmente, as espécies selenito (Se-IV) e selenato (Se-VI) não são eletroquimicamente ativas nesta técnica (Cookeas e Efstathiou, 1994). Foi utilizado um eletrodo de pasta de carbono como eletrodo de trabalho, um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar, e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência. A voltagem aplicada foi de 850 mV, conforme referência acima. Neste sistema de detecção, é aplicada entre os eletrodos uma diferença de potencial, que é mantida constante durante a análise. O eluente deve conter espécies aptas a

conduzir corrente elétrica. São detectáveis as espécies que podem ser oxidadas na superfície do eletrodo de trabalho em potenciais iguais ou mais positivos que aquele mantido entre os eletrodos. A corrente adicional gerada é proporcional à concentração do analito. Estes experimentos envolvem processos heterogêneos de transferência de elétrons da solução utilizada como eluente para o eletrodo de trabalho empregado. A Figura 6 ilustra o processo.

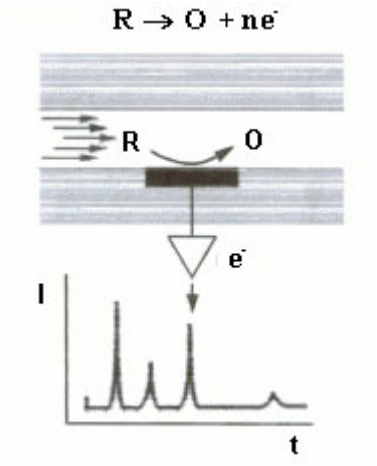

Figura 6 - Representação esquemática do processo de detecção amperométrica (R é o analito na sua forma reduzida, O na forma oxidada)

Vários sistemas de eluentes foram empregados visando uma boa separação e curto tempo de análise. A natureza do funcionamento do detector de condutividade limitou a escolha da concentração do íon do eluente, responsável pelo deslocamento das espécies injetadas na coluna de separação. A presença de modificadores orgânicos no eluente também foi limitada. Embora o teor de modificador orgânico pudesse não ser problemático para detecção condutimétrica ou amperométrica, poderia ser problemático para a detecção via ICPMS. O supressor de condutividade, importante acessório nas detecções condutimétricas, também tem limitações com relação à composição do eluente. Em suma, o eluente além de proporcionar eficiente e rápida separação, deve ser compatível com o sistema de detecção usado. Neste estudo procurou-se, desde o início, optar por uma composição do eluente que fosse compatível, principalmente com ICPMS, dado às exigências para a estabilidade do plasma e a sua eficiência de ionização,

além do potencial erosivo de soluções muito salinas em relação ao conjunto amostrador/*skimmer* utilizado no espectrômetro de massa. Eram conhecidas a complexidade da matriz de efluentes e as concentrações relativamente baixas de selênio total. Sabendo-se da necessidade de diluição das amostras para proteção da coluna de separação, e que as concentrações das espécies individuais poderiam ser ainda muito menores, seria imprescindível o uso de ICPMS sob estas condições de detectabilidade.

Os seguintes sistemas de eluição foram avaliados quanto à eficiência nas separações, tempo de análise e fator de capacidade. Foram testados parâmetros como vazão do eluente, concentração do íon eluente, presença e concentração de modificadores orgânicos, já visando futura compatibilidade com os sistemas de nebulização e detecção em ICPMS.

- carbonato de sódio
- carbonato de sódio e bicarbonato de sódio
- carbonato de sódio e hidróxido de sódio
- Ftalato/ácido ftálico
- Iodeto de sódio
- Perclorato
- Ácido p-hidroxibenzóico
- Ácido cianúrico (1,3,5 trihidroxi-triazina)
- Ácido cianúrico e perclorato

Todas as soluções utilizadas com eluentes foram submetidas à ultra-sonificação por quinze minutos com a finalidade de serem degaseificadas, conforme recomendação feita pelo fabricante. Foram preparadas, diariamente, a partir de reagentes de alta pureza (Merck), com exceção do ácido cianúrico (AC), adquirido de um produto disponível no comércio (STABILCLOR - GENCO) com aplicação original destinada à estabilização de cloro em águas de piscinas. Antes do emprego para o preparo das soluções dos eluentes, este reagente passou por um processo convencional de recristalização em água quente (Maurino e Minero,

1997). Foram preparadas soluções com o reagente purificado e a pureza foi averiguada pela análise multielementar usando a técnica de ICPMS no modo semiquantitativo (TotalQuant®). Durante a etapa de otimização foi avaliada também a influência da temperatura da coluna no comportamento de retenção e no formato de pico da espécie. Para isto, adaptou-se um banho de água num recipiente posicionado ao lado do módulo 733 IC (Centro de Separação), permanecendo a coluna cromatográfica inteiramente submersa durante o processo de separação. Nas ocasiões onde foi utilizado o supressor de condutividade, empregou-se solução de ácido sulfúrico (Merck) 0,05 mol L^{-1} como solução regenerante e água Milli-Q para rinsagem da câmara regenerada imediatamente antes. A pressão no sistema cromatográfico foi monitorada ao longo de todo o trabalho no cromatógrafo de íons de forma a se preservar a coluna (respeitando a pressão máxima recomendada) e identificar possíveis necessidades de manutenção.

O quadro abaixo mostra algumas informações sobre as características dos detectores utilizados durante a etapa de desenvolvimento da metodologia de separação.

Detector de condutividade:

Faixa de medição -100 a 10000 $\mu S.cm^{-1}$
Constante da célula – 16,7
Volume da célula – 1,5µL
Princípio de medição – medição de corrente alternada
Estabilidade da temperatura - ≤ 0,01^{o}C para temperatura ambiente constante

Detector amperométrico:

Técnica de medição – amperometria de corrente direta
Voltagem de polarização: -1990mV até +1990mV
Corrente de compensação: -20nA até +20nA
Faixa de temperatura de operação: +5 até +40 ^{o}C.

4.2.
Especiação de compostos inorgânicos de selênio por IC-ICPMS

Os primeiros resultados obtidos sobre a problemática da separação evidenciaram que, a partir de um determinado ponto, a fase final do processo de otimização teria que ser realizada utilizando-se o próprio ICPMS como detector para o selênio. Deste modo, até quando foi possível, utilizaram-se os sistemas de detecção disponíveis no cromatógrafo de íons. A partir daí, o registro da separação das espécies de selênio e a quantificação foram feitos trabalhando-se num sistema IC-ICPMS, conforme ilustrado pela Figura 7.

Figura 7 - Fotografia do sistema cromatográfico e seu acoplamento com o ICPMS.

Neste sistema, a coluna de separação utilizada (após definição pela etapa de otimização) foi a Metrosep A Supp1, já descrita anteriormente. Esta coluna foi adquirida junto ao fabricante quando já havia sido iniciado o trabalho de otimização no cromatógrafo, e, deste modo, não havia sido utilizada anteriormente. Padrões mistos contendo ânions comuns foram injetados na coluna de separação e os resultados reproduziram a separação esperada, conforme especificação do fabricante, utilizando-se carbonato de sódio (0,003 mol L^{-1})

como eluente e uma vazão de 1,0 mL min^{-1}. Essa verificação foi feita no próprio cromatógrafo de íons mencionado anteriormente.

No sistema IC-ICPMS, a saida da coluna de separação foi acoplada ao conjunto nebulizador Meinhard/câmara ciclônica através de um capilar de PEEK com cerca de 35 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Foi experimentado também um nebulizador ultrasônico (mod. AT 6000 da firma CETAC (EUA). O espectrômetro de massa utilizado foi modelo ELAN 5000A (PerkinElmer-Sciex, Norwalk, CT, USA). O instrumento é do tipo quadrupolo com resolução de massa de 0,6 a 0,8 *u* (unidade de massa atômica). Antes do início das medições, o equipamento era otimizado (posição de amostragem e vazão do gás nebulizador) e a sensibilidade (íons s^{-1}) verificada pela avaliação da intensidade de sinal resultante da aspiração de uma solução analítica mista contendo os elementos Mg, Rh, Ba e Pb, todos com concentração de 10 μg L^{-1}.

As taxas de contagem para estes elementos foram superiores aos mínimos estabelecidos pelo fabricante devido à utilização de um sistema de introdução de amostra mais eficiente (nebulizador Meinhard/câmara ciclônica, amostrador e *skimmer* de platina). Foram selecionados, para as medições, três isótopos de selênio (Se^{77}, Se^{78} e Se^{82}). Em análises por ICPMS, rotineiramente, monitora-se (quando for possível) isótopos diferentes de forma a avaliar/corrigir interferências espectrais causadas pela sobreposição nas razões m/z (isobáricas e/ou poliatômicas). Na etapa de otimização dos parâmetros operacionais busca-se compromisso favorável entre sinais maiores e menores taxas de formação de óxidos e íons divalentes. De modo prático, a aspiração de uma solução de Ce e o monitoramento da razão CeO/Ce^{+} fornece informação sobre a taxa de formação de óxidos e a aspiração de uma solução de Ba e o monitoramemto da razão Ba^{+2}/Ba^{+} fornece informação sobre a taxa de formação de íons divalentes. A potência da radiofrequência aplicada ao plasma é outro parâmetro importante a ser otimizado.

Em análises por ICPMS (pelo modo quantitativo ou semiquantitativo), emprega-se rotineiramente um ou mais elementos como “padrão interno” para a correção de variações nas medidas causadas por variações no sistema de nebulização, na energia do plasma, na amostragem através da interface do espectrômetro, e na produção de sinais (eletrons) pelo detector. Normalmente,

este(s) elemento(s) deve(m) estar presente(s) em todas as soluções medidas e suas intensidades são utilizadas pelo programa de processamento de dados do instrumento para a normalização das intensidades dos elementos a serem determinados. Neste trabalho, para efeito de controle das medições dos sinais transientes obtidos pelo sistema IC-ICPMS, empregou-se ^{115}In como padrão interno. Uma segunda bomba isocrática (idêntica àquela utilizada para o eluente) foi utilizada para bombear uma solução de ^{115}In, que antes de atingir o sistema de nebulização foi misturada com o efluente da coluna de separação (adição de padrão interno pós-coluna) por meio de uma conexão em forma de "T". Deste modo, foi possível monitorar durante toda a corrida cromatográfica o sinal do padrão interno, cuja solução se juntava ao efluente da coluna, sendo nebulizada simultâneamente. A Figura 8 representa um diagrama em bloco de um ICPMS, tal com o utilizado neste trabalho.

Figura 8 - Diagrama em bloco de um ICPMS semelhante ao utilizado neste trabalho.

A Tabela 6 reúne alguns dos parâmetros de operação e medição importantes utilizados neste trabalho envolvendo ICPMS como detector em análise de especiação de selênio.

Tabela 6 - Parâmetros operacionais utilizados em ICPMS.

Equipamento: ELAN 5000A, PerkinElmer-Sciex
Potência: 1250 W
Vazão de argônio (L min^{-1}) : 0.95 no nebulizador; 1.0 auxiliar; 15.0 no plasma
Nebulização: Meinhard com câmara ciclônica: taxa de aspiração de 1.5 mL min^{-1}
Isótopos monitorados: ^{77}Se, ^{78}Se, ^{82}Se e ^{115}In (padrão interno)
Amostrador/Skimmer: ambos de platina
Parâmetros de medição
Modo de varredura: "peak hop transient"
"**Dwell time**": 50 ms
Leituras por replicata: 900
Número de replicatas: 1
Tempo de uma corrrida: 7.6 minutos

A vazão do eluente, controlado pelo sistema de bombeamento, foi de 1,5 mL min^{-1} . Foi utilizada uma bomba isocrática com transdutor de pressão (série LC 200, PerkinElmer) para promover a vazão desejada. A pressão do sistema durante as análises foi de 820 psi. As amostras foram introduzidas através de uma seringa estéril (Plastipak) de 1,0 mL de capacidade em uma alça de amostragem de 500 µL feita de aço inoxidável, conectada a uma válvula injetora (Rheodyne, modelo 7725i). Após um tempo de espera de 5 segundos, era iniciada a seqüência de medição no ICPMS. Todas as amostras foram filtradas (filtro de membrana com poros de 0,45µm, de acetato de celulose - MFS) e diluídas vinte vezes com o próprio eluente, imediatamente antes do procedimento de carregamento da alça de amostragem. As soluções-estoque de Se(IV), Se(VI) e $SeCN^{-1}$ foram preparadas a partir dos reagentes citados (Na_2SeO_3, $Na_2SeO_4.10H_20$ e KSeCN) e utilizou-se água MilliQ (>16MΩcm) para aferição de volume. As soluções usadas em procedimentos de calibração (2,5; 5; 8; 10; 25 e 50 ng mL^{-1}) foram preparadas sempre no dia das análises a partir de diluição das soluções-estoque de 1000 µg mL^{-1}, utilizando para tal também o próprio eluente.

4.3.
Determinação de selênio total por FI-HG-ICPMS

A técnica de geração de hidretos foi aplicada na determinação da concentração total de selênio nos efluentes, uma vez que interferências espectrais causadas pela matrix complexa das amostras (p.ex. $^{40}Ar^{37}Cl$, $^{81}Br^{1}H$) impossibilitaram a determinação direta deste elemento. Nesta técnica, um agente redutor ($NaBH_4$, normalmente) é adicionado à amostra previamente acidificada contendo o elemento a ser determinado. A reação é instantânea e o analito, sob a forma de um composto volátil (p.ex. H_2Se, AsH_3) é quantitativamente separado da matriz e carreado em direção ao detector.

Um aspecto desta técnica é a influência do estado de oxidação do analito na eficiência de geração do hidreto. No caso dos elementos do grupo 5A e 6A, apenas íons no estado de oxidação +3 e +4, respectivamente, podem ser diretamente reduzidos. Deste modo, deve-se executar um procedimento de pré-redução quando se pretende determinar os elementos no seu estado mais oxidado (+5, +6). Comumente se emprega HCl 4-6 mol L^{-1}, a quente, para promover a redução de Se (VI), em sistemas fechados. A temperatura, a concentração do pré-redutor e a duração do aquecimento afetam sobremaneira e eficiência da pré-redução. As condições ótimas, reportadas na literatura, são controversas. A garantia que as soluções usadas como pontos da curva analítica passem por procedimento de pré-redução idêntico ao das amostras, possibilita a quantificação.

Embora tendo um excelente potencial em análise de especiação de As, Se, Sb e outros elementos, a técnica de geração de hidretos não foi aplicada neste trabalho para esta finalidade, pois se verificou que a espécie $SeCN^-$ é só parcialmente reduzida por solução de $NaBH_4$ e que a matriz complexa impedia uma redução quantitativa mesmo de Se(IV), sendo necessária um oxidação prévia da amostra com HNO_3 concentrado, antes da pré-redução com HCl ou HBr e posterior geração de hidretos com $NaBH_4$. Obviamente, tal procedimento invalidaria qualquer informação sobre as espécies originalmente presentes.

Neste estudo, a técnica FI-HG-ICPMS foi utilizada empregando-se um sistema FIAS-200 (Perkin Elmer). Parâmetros como vazão de argônio no nebulizador e a potência do plasma foram ajustadas nos dias das análises. As vazões do carreador (HNO_3) e do redutor ($NaBH_4$) foram 10 mL min^{-1} e 5 mL min^{-1}, respectivamente. O volume da alça de amostragem foi de 200 µL. Na redução foi utilizada uma solução de $NaBH_4$ 3% m/v (p.a. Merck), preparado em meio NaOH 1% m/v (p.a. Merck) para fins de estabilização, e sempre no dia das análises.

Foram preparados pontos da curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 ng mL^{-1}. A solução-fonte de selênio tinha concentração de 100 ng mL^{-1}. A Tabela 7 mostra, esquematicamente, o procedimento adotado na construção da curva analítica.

Tabela 7 - Dados relativos à construção da curva analítica para determinação de selênio total por FI-HG-ICPMS. (Volumes de reagentes em mL. Solução de selênio com concentração de 100 ng mL^{-1}).

	1º ponto	2º ponto	3º ponto	4º ponto	5º ponto	6º ponto	branco
HCl_{conc}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
H_2O	9.98	9.9	9.8	9.5	9.0	8.0	10.0
Se	0.02	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	-

Neste trabalho, a pré-redução foi realizada com HCl 6 M e aquecimento a 95^0 C de no mínimo 60 minutos, condições essas, adaptadas de Hill et al. (1995). Como já mencionado, esta etapa teve como objetivo obter informação relativa à concentração total de selênio nas amostras de efluentes. Para tal, as amostras passaram por três tipos de tratamento, antes da determinação de selênio total por FI-HG-ICPMS.

- Filtração → Oxidação → Pré-redução → Det. Se total por FI-HG-ICPMS.
- Oxidação → Pré-redução → Det. Se total por FI-HG-ICPMS.
- Filtração → Pré-redução → Det. Se total por FI-HG-ICPMS.

No procedimento de oxidação, a 2 mL da amostra foram adicionados 3 mL de HNO_3 concentrado. A mistura foi aquecida a $90^{\underline{0}}$ C e permaneceu sob aquecimento por período de tempo suficiente para evaporar até quase a secura. Em seguida, o volume foi levado a 2 mL com água Milli-Q. Esta solução passou pela etapa de pré-redução, necessária para a subseqüente geração do seleneto de hidrogênio.