

## 5 Resultados e discussão

Os resultados obtidos durante os procedimentos de otimização da separação cromatográfica podem ser divididos em três fases distintas. Na fase inicial, foram exaustivamente testados sistemas de eluentes baseados em carbonato. Este íon apresenta, relativamente, boa força de eluição. Em uma segunda fase, foi avaliada a eficiência do ânion cianurato (AC) como eluente para  $\text{SeCN}^-$  e para alguns outros ânions fortemente retidos. Na fase final, foi avaliado o efeito da presença do ânion perclorato como eluente, juntamente com AC, e o efeito de um modificador orgânico (acetonitrila) no formato de pico e no tempo de retenção para as espécies de interesse.

O comportamento de retenção da espécie  $\text{SeCN}^-$ , como será mostrado adiante, foi pronunciadamente diferente do comportamento de retenção das duas outras espécies estudadas. Esta espécie é dita fortemente polarizável ou fortemente hidrofóbica, apresentando intensa afinidade pelas fases estacionárias testadas neste estudo. Desde o início, buscou-se por um procedimento de separação isocrática devido a algumas vantagens desta técnica, como por exemplo, a ausência da necessidade de aguardar a coluna se reequilibrar entre uma injeção e outra, e a própria simplicidade em termos de aparato instrumental.

### 5.1. Detecção condutimétrica de selenito, selenato e selenocianato

Conforme indicado no capítulo anterior, para a etapa que envolveu o uso do detector condutimétrico foram utilizadas soluções contendo apenas os sais puros dos ânions de interesse. Este detector responde a qualquer espécie carregada (não-específico), o que poderia afetar a análise dos resultados. Em geral, os cátions não afetam na medida em que eluem no volume morto. A Figura 9 mostra um cromatograma do padrão de selenato utilizado (CETAC Technologies), contendo ácido nítrico 3% como estabilizante, obtido pela injeção de 100  $\mu\text{L}$  de solução de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de selenato.

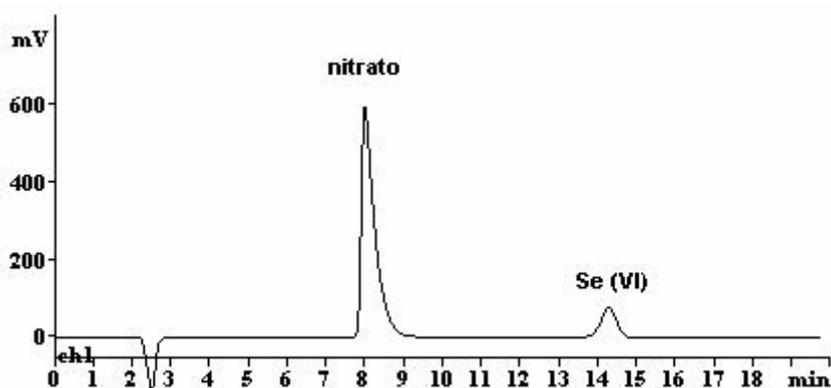


Figura 9 - Cromatograma mostrando a presença de nitrato oriundo do padrão de selenato. Coluna: Metrosep A Supp 4; eluente carbonato 3 mM com vazão de  $1\text{ mL min}^{-1}$ .

Variações na seletividade em cromatografia de íons não é um evento, de certo modo, corriqueiro. Pode-se, dentro de alguns limites, manipular a seletividade pelo controle de parâmetros cromatográficos ligados à fase móvel e à fase estacionária. O comportamento de retenção dos chamados “ânions comuns” pode estimar a afinidade dos íons de interesse neste estudo  $\text{Se(IV)}$ ,  $\text{Se(VI)}$  e  $\text{SeCN}^{-1}$  pelas fases estacionárias testadas. As Figuras 10 e 11 comparam as forças relativas de eluição entre dois sistemas de eluentes. Foram injetados na coluna 100  $\mu\text{L}$  de solução contendo os ânions fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato e fosfato.

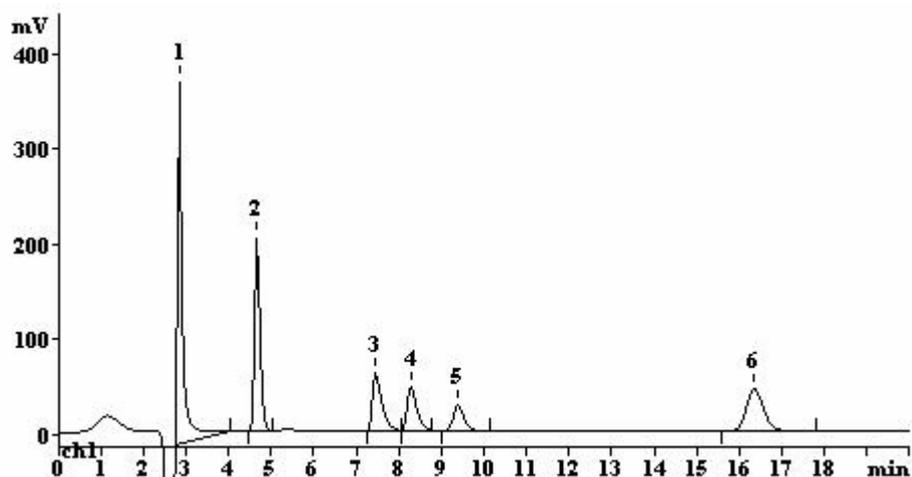


Figura 10 - Cromatograma de ânions comuns. 1 = fluoreto; 2 = cloreto; 3 = nitrito; 4 = brometo; 5 = nitrato; 6 = fosfato. (Coluna: Metrosep A Supp1; eluente carbonato 1,8 mM/bicarbonato 1,7 mM, com vazão de  $1\text{ mL min}^{-1}$ ).

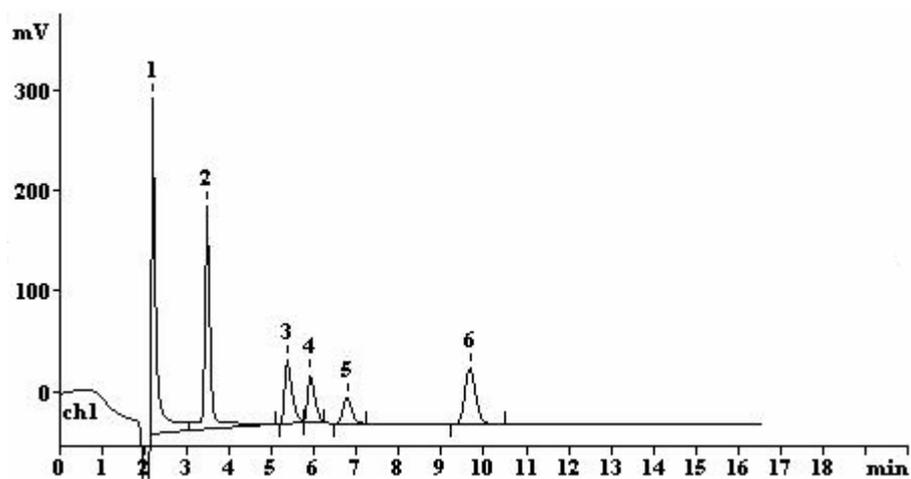


Figura 11 - Cromatograma de ânions comuns. 1 = fluoreto; 2 = cloreto; 3 = nitrito; 4 = brometo; 5 = nitrato; 6 = fosfato. Coluna: Metrosep A Supp1; eluente carbonato 3,5 mM com vazão de  $1\text{ mL min}^{-1}$ .

Estes resultados mostraram que a coluna Metrosep A Supp1 reproduzia o desempenho de separação indicado pelo fabricante. O tempo de retenção para nitrato já mostrava que, certamente, a espécie  $\text{SeCN}^-$  eluiria, nestas condições, muito tempo após os 7 min observados para o ânion apenas moderadamente polarizável ( $\text{NO}_3^-$ ). Os cromatogramas das Figuras 12 e 13 mostram o comportamento de retenção para selenito e selenato na mesma coluna e nas condições indicadas.

Nas duas Figuras, o pico 2, que elui em torno de 5,5 min, é correspondente ao ânion nitrato.

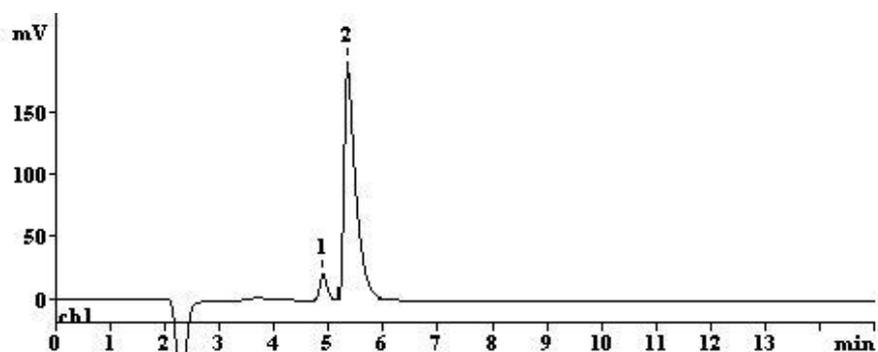


Figura 12 - Cromatograma mostrando selenito (pico1) e nitrato (pico2). Coluna: Metrosep A Supp1; eluente carbonato 5 mM com vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

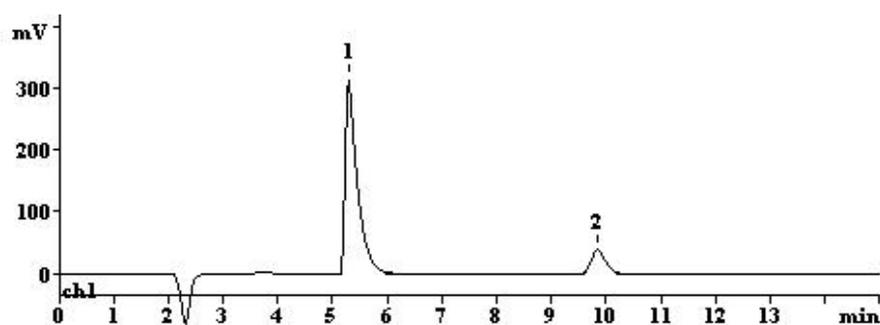


Figura 13 - Cromatograma mostrando selenato (pico2) e nitrato (pico1). Coluna: Metrosep A Supp1; eluente carbonato 5 mM com vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

Os resultados mostram que o emprego de eluente carbonato (considerado um eluente com boa força de eluição, na concentração indicada, e apresentando-se como íon  $\text{CO}_3^{2-}$ ), acarretaria em tempo longo de análise. Sob estas condições, o terceiro ânion presente ( $\text{SeCN}^{-1}$ ) não foi detectado, mesmo após a corrida cromatográfica ter transcorrido até 30 min. Um parâmetro simples a ser explorado para encurtar o tempo de análise, desde que não comprometa a separação e detecção, é a vazão do eluente. Limites de pressão, dentro das especificações de cada coluna, devem ser acompanhados. A Figura 14 mostra o comportamento de

selenito e selenato com a mesma coluna e eluente da Figura 14, porém com a vazão do eluente elevada a  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

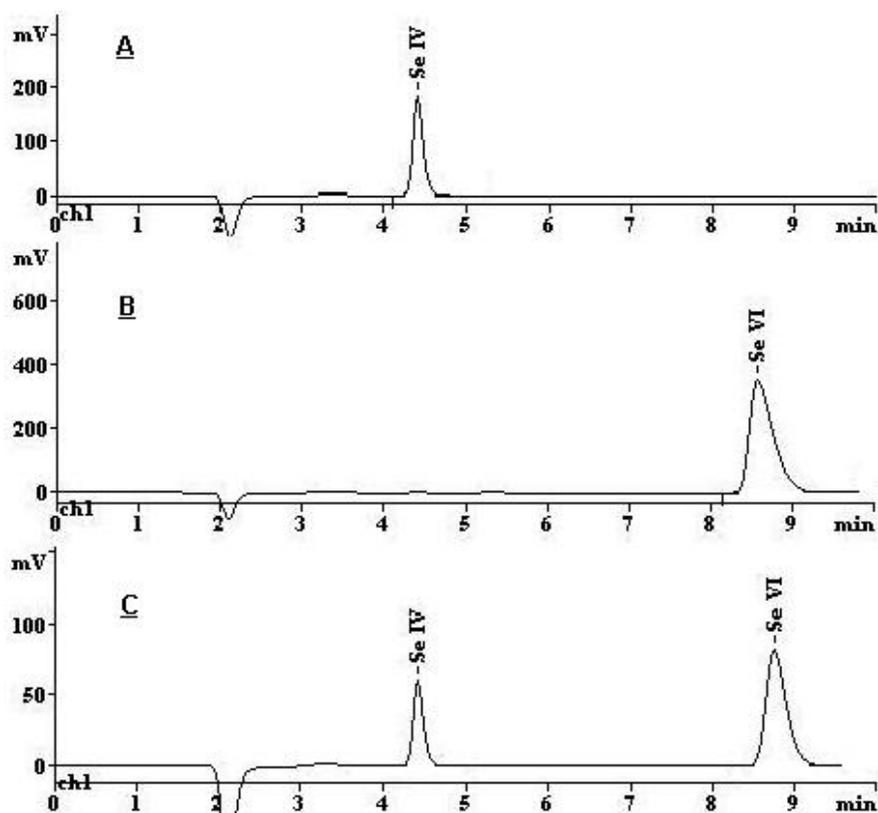


Figura 14 - Cromatograma mostrando a separação de selenito e selenato. A – apenas selenito; B – apenas selenato; C – selenito e selenato. Condições experimentais idênticas as da figura 13, com exceção da vazão do eluente ( $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ ).

Durante a etapa de otimização, a vazão máxima do eluente testada foi de  $1,5 \text{ mL min}$ . Se um sistema eluente não proporcionasse resolução eficiente e rápida com este valor de vazão, outros fatores (concentração do eluente e modificadores, por exemplo) eram focalizados. A Figura 15 mostra um cromatograma onde as três espécies de interesse foram injetadas na coluna, sob as condições da Figura 14 (carbonato  $5 \text{ mM}$ , vazão de  $1,5 \text{ mL min}$  e coluna Metrosep A supp1). Nenhum registro de sinal para o ânion  $\text{SeCN}^-$  foi obtido

nestas condições após 26 minutos de corrida cromatográfica, confirmando que esta espécie apresenta forte afinidade pela fase estacionária em teste.

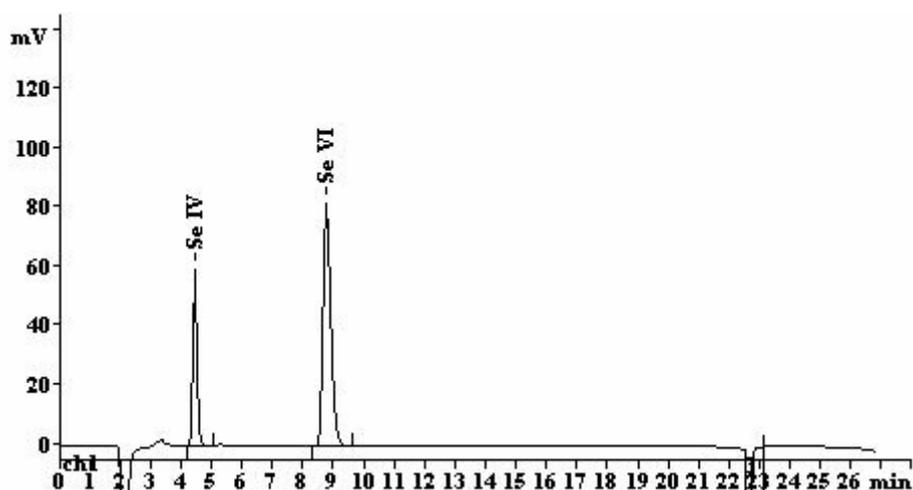


Figura 15 - Cromatograma mostrando a separação de selenito e selenato. Condições experimentais como na Fig. 15.

Será mostrado, posteriormente, que o emprego de carbonato como eluente mesmo com concentração de 50 mM ainda é insuficiente para deslocar da coluna de separação a espécie  $\text{SeCN}^{-1}$ . No experimento realizado (carbonato 50 mM como eluente e detecção por ICPMS), apenas após 45 minutos foi possível observar registro de sinal relativo ao ânion. O perfil do pico obtido, como esperado nestes casos, foi extremamente largo. A Figura 16 mostra que menos de 8 minutos são suficientes para deslocar os ânions selenito e selenato da coluna, aumentando-se a concentração do eluente carbonato para 8 mM. A maior concentração deste eluente aqui testada foi de 12 mM (Figura 17), em virtude da necessidade de manutenção do bom funcionamento do supressor de condutividade.

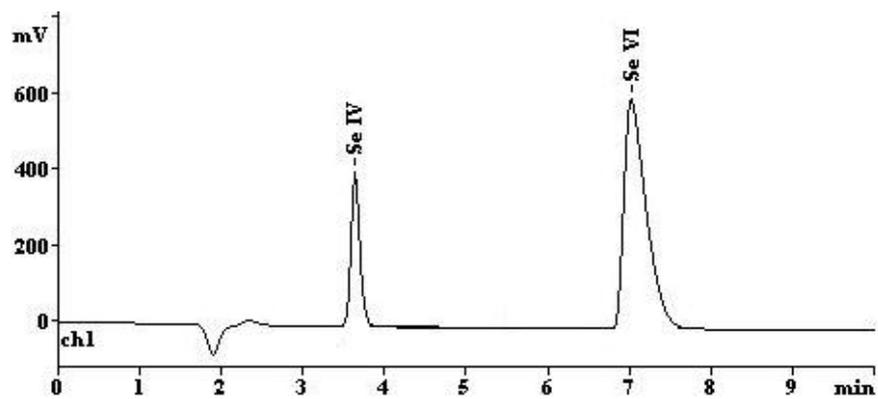


Figura 16 - Cromatograma mostrando a separação de selenito e selenato com o eluente carbonato 8 mM. As demais condições são idênticas à Figura 14.

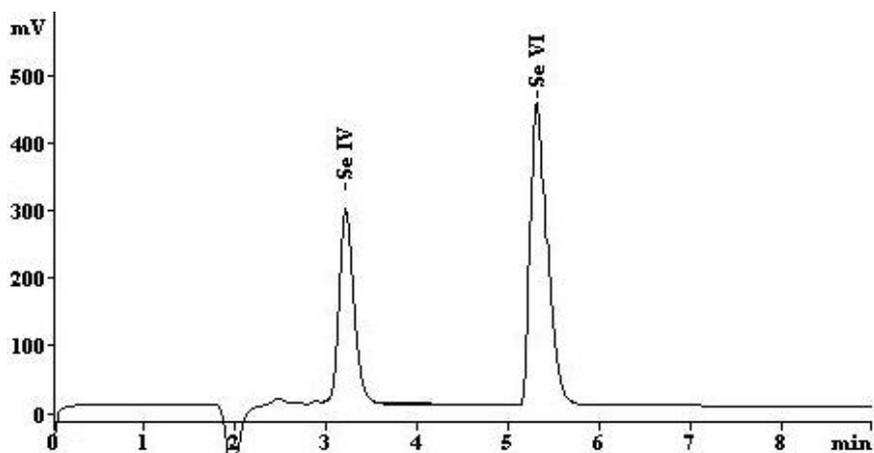


Figura 17 - Cromatograma mostrando a separação de selenito e selenato com o eluente carbonato 12 mM. As demais condições são idênticas à Figura 14.

Nas figuras anteriores (16 e 17), a corrida cromatográfica transcorreu até 30 minutos sem que a espécie selenocianato fosse detectada. A coluna Hamilton PRP-X100, já descrita anteriormente, foi também testada na etapa de otimização. A Figura 18 mostra o comportamento de retenção e formato de pico obtido para a espécie selenito. Este e outros resultados mostraram que esta coluna estava com desempenho comprometido, uma vez que deveria separar com eficiência os íons selenito e selenato. Optou-se, por isso, pelo abandono da utilização desta coluna.

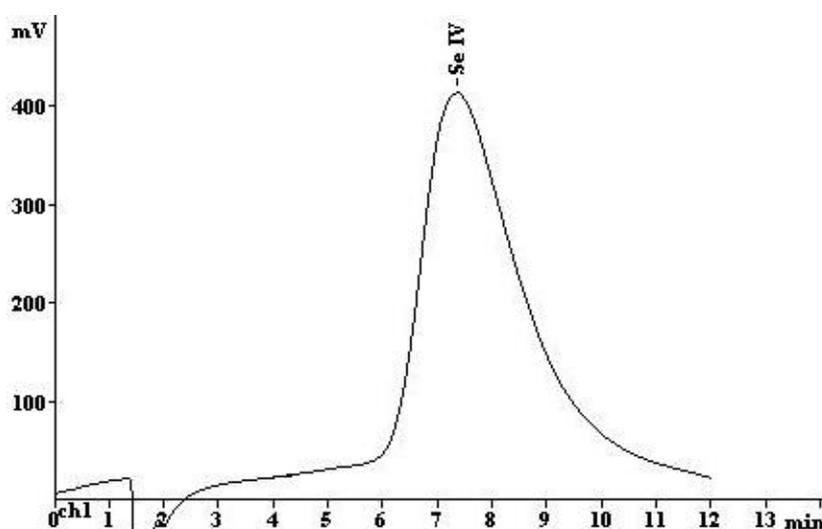


Figura 18 - Cromatograma mostrando o formato alargado do pico de selenito na coluna Hamilton PRP-X100. Condições experimentais: eluente carbonato 5 mM com vazão de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ ).

A coluna Metrosep A Supp 4 também foi avaliada na etapa de busca pelas condições ótimas de separação. No entanto, segundo o próprio fabricante, esta coluna não é adequada para aplicações em matrizes extremamente complexas, tais como os efluentes industriais aqui estudados. Além disto, tem restrições quanto ao pH dos eluentes empregados. Mesmo assim, é interessante porque o  $\text{SO}_4^{-2}$  elui em apenas 12 minutos e a coluna tem boa resolução na região do cromatograma logo após o volume morto. De modo contrário, a coluna Metrosep A Supp1 retém mais fortemente o sulfato (cerca de 24 minutos). Ensaio com a Metrosep A Supp 4 não se mostraram vantajosos para o problema em questão, tendo selenito eluído

somente após 9 minutos (eluente padrão: carbonato 1,8 mM/ bicarbonato 1,7 mM). Os eluentes empregados em análise de íons por cromatografia de troca iônica e detecção condutimétrica devem ser aptos a serem neutralizados pós-coluna pelo sistema de supressão de condutividade, visando a diminuição da condutividade do eluente antes da sua passagem pelo detector. Os ânions carbonato e bicarbonato (alta condutância nas concentrações utilizadas) são, por exemplo, convertidos em ácido carbônico fracamente dissociado, e, portanto é deste modo reduzida a “condutividade de fundo”. Os ânions eluentes baseados em hidróxidos (OH<sup>-</sup>) são convertidos em água quando atingem o sistema de supressão. Outra opção é o emprego de eluentes que sejam capazes apresentarem boa força de eluição, mesmo em baixas concentrações (p.ex., ácido ftálico). Neste caso, pode-se dispensar a supressão de condutividade; porém, existem colunas de baixa capacidade especialmente desenvolvidas para este tipo de eluente. Apenas para investigação do comportamento de retenção de selenito foram testados, mesmo atipicamente, os eluentes ftalato e ácido p-hidroxi benzóico. Os resultados são mostrados nas Figuras 19 e 20. Investigações sistemáticas sobre o emprego destes eluentes não foram continuadas no decorrer deste trabalho, uma vez que se apostava em desempenho superior do ácido cianúrico, como será mostrado a seguir.

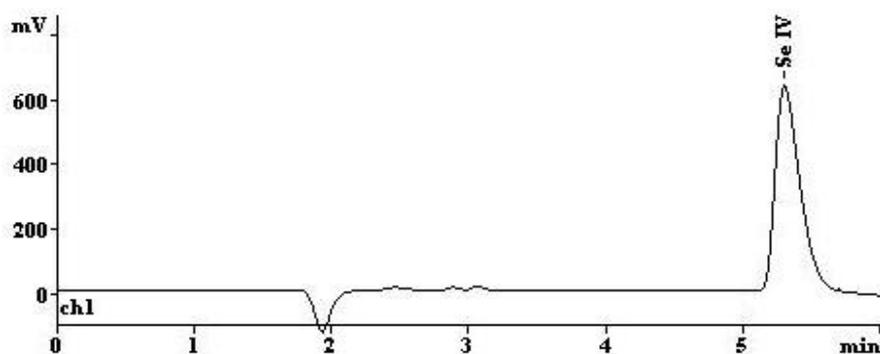


Figura 19 - Cromatograma mostrando o pico de selenito na coluna Metrosep A Supp1. (Condições experimentais: eluente ácido p-hidroxibenzóico 5 mM, pH = 4, vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>).

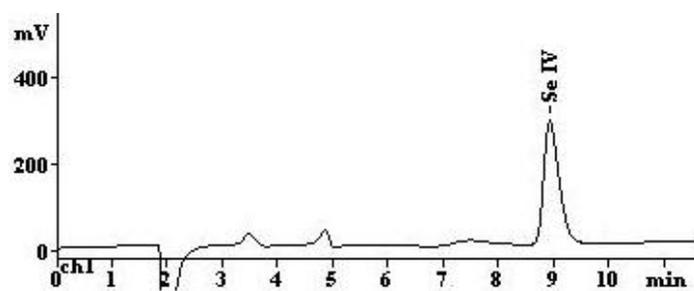


Figura 20 - Cromatograma mostrando o pico de selenito na coluna Metrosep A Supp1. (Condições experimentais: eluente ftalato 5 mM, pH = 4,5, vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Coluna Metrosep A Supp1)

## 5.2. O emprego de ácido cianúrico como eluente

Nos capítulos anteriores foi mencionada a habilidade dos ânions cianurato para o deslocamento de espécies fortemente retidas em colunas trocadoras aniônicas. A Figura 21 mostra a fórmula estrutural plana do ácido cianúrico (1,3,5-trihidroxitriazina).

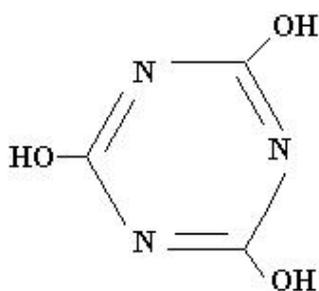


Figura 21 - Fórmula estrutural plana do AC.

Em todas as ocasiões, neste trabalho, onde foi utilizado o ácido cianúrico ( $\text{H}_3\text{CA}$ ) como eluente, trabalhou-se com a espécie duplamente carregada ( $\text{HCA}^{2-}$ ). Para tal, os dois prótons dissociáveis do AC foram neutralizados pelo emprego de quantidade equivalente de hidróxido de sódio. Ácido cianúrico foi utilizado pela primeira vez por Maurino e Minero (1997) como eluente na cromatografia de ânions com detecção condutimétrica após supressão. Os autores apontaram como principais vantagens deste eluente: a baixa condutividade de fundo após supressão, boa linearidade nas calibrações, possibilidade de trabalho com sistemas de gradiente (sem distúrbios proibitivos na linha de base), larga faixa de força de eluição e melhora na sensibilidade para determinação de ânions de ácidos carboxílicos. Foram vantagens importantes sobre o desempenho dos eluentes mais comumente empregados (carbonato/bicarbonato, tetraborato e hidróxido) em análises de ânions por cromatografia de troca aniônica e detecção condutimétrica. Paralelamente, notaram a habilidade deste íon eluente (cianurato) para eluir os

ânions iodeto, tiocianato, cromato, tiosulfato e perclorato em tempos curtos. Mostraram, comparando fatores de capacidade, que a forma duplamente dissociada do ácido cianúrico é um eluente com maior força de eluição que o carbonato, especialmente para os ânions supracitados. O ácido cianúrico é um ácido triprótico com  $pK_{a1} = 7,3$ ;  $pK_{a2} = 11,1$  e  $pK_{a3} > 14$ <sup>18</sup>. O controle de pH possibilita facilmente a determinação de qual íon predominará e deste modo, amplia a faixa de força de eluição possível.

As informações contidas nesta publicação tiveram importante implicação para o presente trabalho: se o ânion cianurato é um eluente forte para os ânions iodeto, tiocianato, perclorato, tiosulfato e cromato (todos exibem forte retenção frente às fases estacionárias desenvolvidas para aplicações comuns), então poderia também ser um eluente “ideal” para a espécie alvo deste estudo, o selenocianato. Logo, os primeiros ensaios realizados mostraram a força de eluição desta espécie para os ânions de interesse. Foi verificada a eluição das três espécies em tempos compatíveis com a prevista detecção por ICPMS, necessária para a análise de efluentes.

Quanto a sua utilização em sistemas convencionais de detecção (condutimétrica ou amperométrica), este eluente pode ser facilmente neutralizado no sistema de supressão do cromatógrafo de íons. A condutância observada após supressão foi tipicamente  $6 \mu\text{S cm}^{-1}$ , menor que os  $16 \mu\text{S cm}^{-1}$  tipicamente medidos no eluente carbonato. Esta informação contribui para averiguar a eficiência do procedimento de purificação praticado (recristalização em água quente).

Serão mostrados também neste capítulo, o efeito da adição de acetonitrila no perfil de separação obtido e o efeito da adição do ânion perclorato, principalmente no formato de pico das espécies de interesse. Adicionalmente será mostrado o uso do ânion iodeto (I<sup>-</sup>) como eluente.

As Figuras 22, 23 e 24 mostram os primeiros ensaios envolvendo a aplicação de AC como eluente evidenciando a sua boa força de eluição. A vazão foi diminuída, com relação aos cromatogramas apresentados anteriormente para

os outros sistemas de eluição, visando a sua melhor compatibilidade com o nebulizador utilizado em ICPMS. Pode-se observar o marcante o efeito da presença de acetonitrila no eluente, minimizando a afinidade dos íons pela fase estacionária. Este efeito da acetonitrila é descrito como típico para ânions considerados hidrofóbicos.

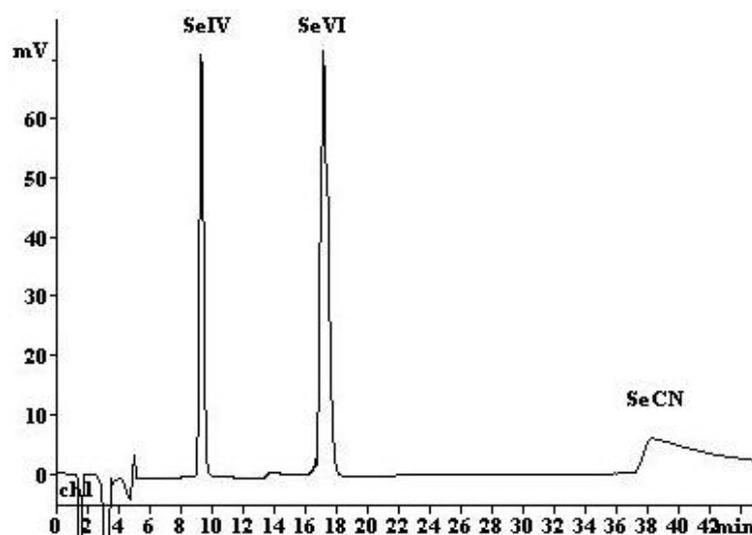


Figura 22 - Cromatograma das três espécies de selênio na ausência de acetonitrila no eluente, AC 3 mM.

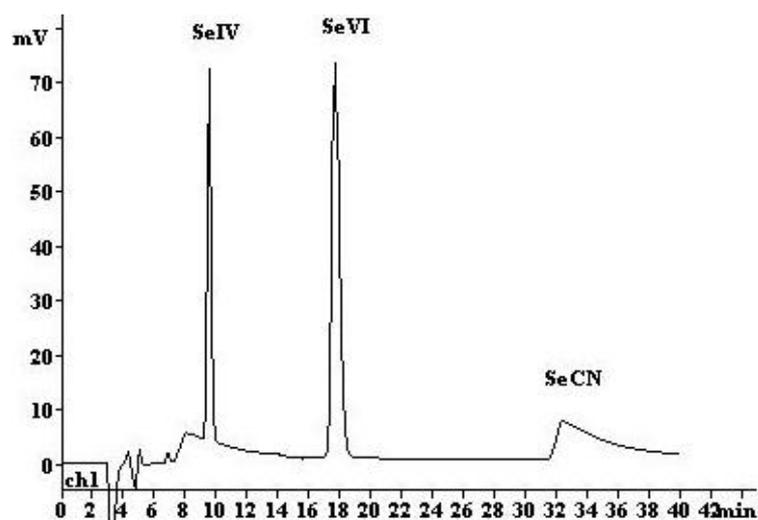


Figura 23 - Cromatograma das três espécies de selênio mostrando o efeito de acetonitrila na separação: adição de 2,5 % de acetonitrila (ACN) ao eluente AC 3 mM.

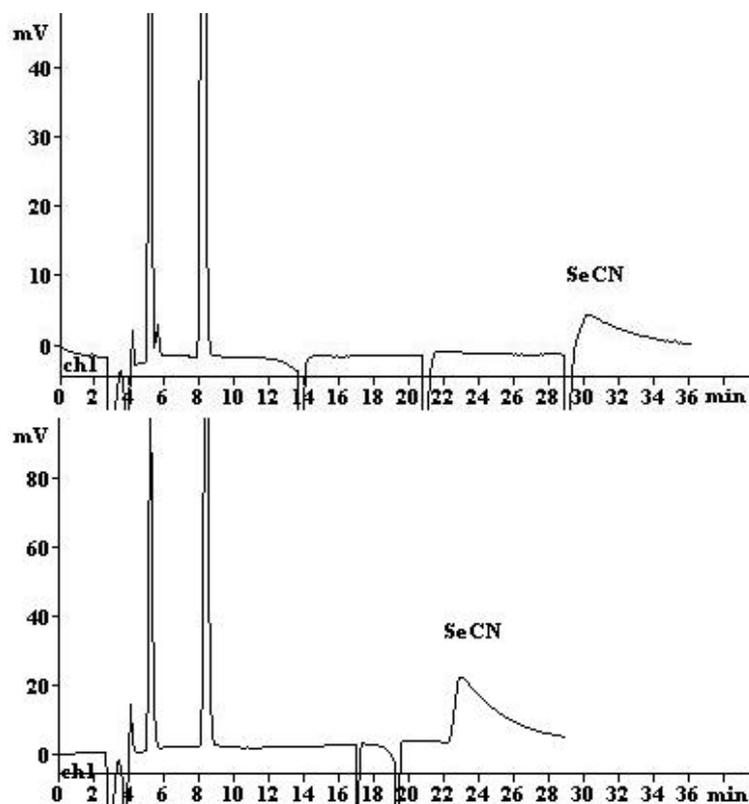


Figura 24 - Cromatograma das três espécies de selênio mostrando o efeito de acetonitrila no eluente: Fig. superior – sem acetonitrila; Fig. inferior com adição de 2,5 % de acetonitrila (Outras condições experimentais: AC 6 mM, vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp 1).

Os cromatogramas da Figura 25 mostram novamente o emprego do AC como eluente, porém com concentração elevada para 9 mM. As linhas observadas entre o segundo e terceiro pico são relativas a um evento ocorrido no sistema de supressão (troca de câmara durante a corrida cromatográfica). Nota-se que apesar da redução da retenção de  $\text{SeCN}^-$ , conserva-se ainda um perfil muito largo e assimétrico do pico.

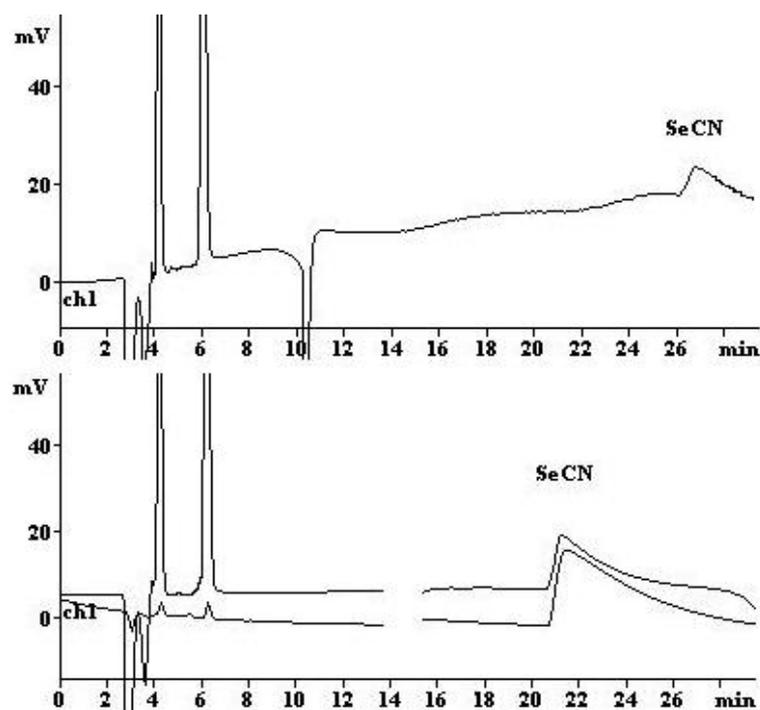


Figura 25 - Cromatograma das três espécies de selênio mostrando o efeito de acetonitrila no eluente: Fig. superior – sem acetonitrila; Fig. inferior com adição de 2,5 % de acetonitrila eluente (Outras condições experimentais: AC 9 mM, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, coluna Metrosep A Supp 1).

A Figura 25 (inferior) mostra o registro de dois sinais. O sinal acima é referente ao detector de condutividade e o de baixo, ao detector amperométrico. Neste caso, os dois detectores foram utilizados em série. O efluente da coluna de separação seguiu, primeiramente, ao detector condutimétrico (não destrutivo) e em seguida foi direcionado ao detector eletroquímico. A voltagem aplicada foi de 850 mV, seguindo-se sugestão de Cookeas e Efstatiou (1994).

Um ensaio simples pode fornecer informação sobre o comportamento eletroquímico de uma espécie. Caso este comportamento seja desconhecido, carrega-se a alça de amostragem na válvula injetora com a amostra em investigação. Em seguida, adapta-se a saída da válvula injetora diretamente ao sistema de detecção eletroquímico, sem a passagem pela coluna de separação. Podem-se assim construir os voltamogramas e selecionar o potencial a ser aplicado para as análises. Neste estudo foi feito este ensaio, confirmando-se a

detectabilidade da espécie  $\text{SeCN}^-$  pelo detector amperométrico no qual um eletrodo de trabalho de pasta de carbono é utilizado. A Figura 26 mostra novamente o uso dos dois detectores em série. A concentração do eluente foi elevada até 12 mM. Nota-se a dificuldade de trabalho com concentração do eluente maior que 12 mM, para o detector condutimétrico. Este efeito é devido a uma limitação do sistema de supressão.

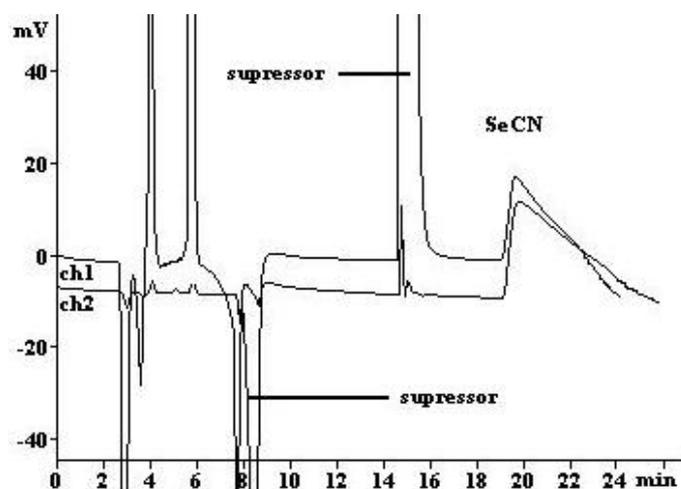


Figura 26 - Cromatograma das três espécies de selênio mostrando o efeito de acetonitrila no eluente: Adição de 2,5 % de acetonitrila eluente (Outras condições experimentais: AC 12 mM, vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1, emprego, em série, de dois detectores).

A partir deste ponto, abandonou-se o uso do detector de condutividade. Os ensaios anteriores mostravam que o problema seria a eluição de selenocianato. Os dois outros ânions, conforme indicado pelos resultados, poderiam ser deslocados da coluna em menos de 6 minutos. Havia ainda a possibilidade de aumento da vazão do eluente.

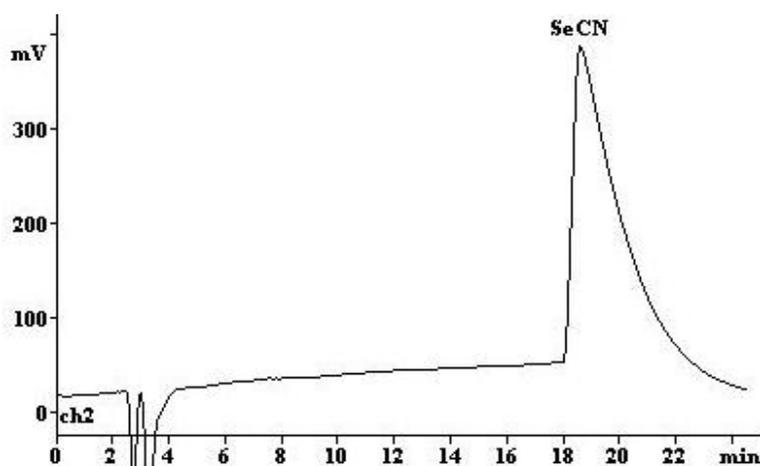


Figura 27 - Cromatograma de selenocianato utilizando detecção amperométrica. (Eluente AC 15 mM, vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1)

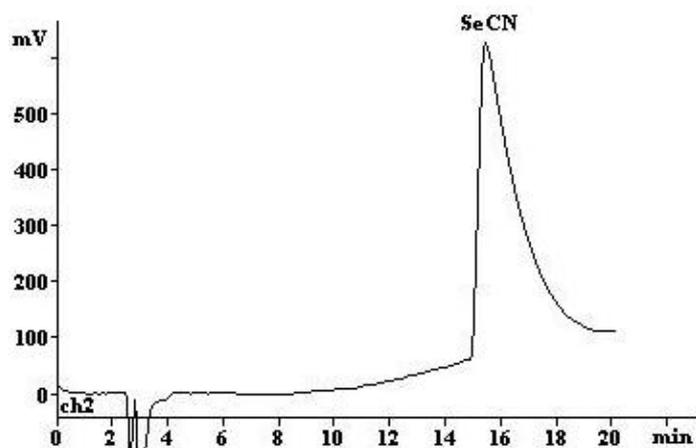


Figura 28 - Cromatograma de selenocianato utilizando detecção amperométrica. (Eluente AC 18 mM, vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1).

Os resultados mostrados nas Figuras 27 e 28 mostram que permaneceu, mesmo com eluente com concentração de 18 mM, o perfil largo do pico. A Figura 29 mostra o efeito do aumento da concentração de acetonitrila de 2,5 % (Figuras 28 e 29) para 10 %.

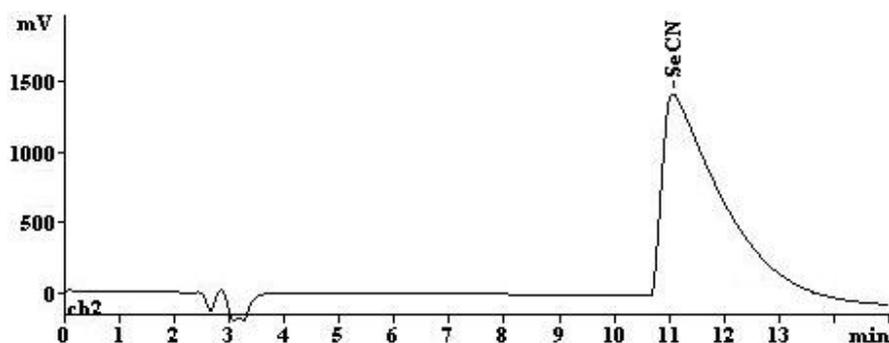


Figura 29 - Cromatograma de selenocianato utilizando detecção amperométrica (Condições experimentais idênticas da Figura 28, exceto o aumento da concentração de acetonitrila para 10 %).

Este ensaio, de certo modo, encerrou o ciclo de tentativa de emprego de apenas AC como ânion eluente. Apesar da diminuição brusca do tempo de retenção da espécie mais fortemente retida, manteve-se o formato largo e assimétrico do pico. O formato de pico melhorou com relação aos outros sistemas eluentes testados, mas poderia ainda comprometer a quantificação. Além disso, a concentração relativamente alta de acetonitrila no eluente (10% v/v) poderia dificultar o uso de ICPMS como detector, requerendo o emprego de uma mistura de argônio/oxigênio no plasma para evitar a deposição de carbono na interface do espectrômetro.

A partir deste ponto, além de testes (não promissores) envolvendo até efeito da temperatura na separação, foi introduzido o ânion perclorato ao eluente. Passaram a ser testadas combinações destes dois ânions como eluente. A motivação foi baseada no conceito da competição entre ânions eluentes com propriedades semelhantes ao ânion fortemente retido, para a resolução do problema. Para tal, foi avaliado o ânion iodeto como eluente, além das combinações de perclorato e AC. Na escala de seletividade em cromatografia de íons, o ânion perclorato se apresenta em posição extrema. Referências na literatura (Jackson et al., 1999) concordam que concentrações de hidróxido de sódio até 150 mM, com adicional uso de p-cianofenol, são necessárias para deslocar este ânion

de colunas trocadoras aniônicas. O fator que torna pouco popular o uso deste ânion adicionado a eluentes, é a impossibilidade de trabalho com detectores condutimétricos uma vez que contribui excessivamente na condutividade da solução. Na Figura 30 segue um cromatograma obtido pelo uso de iodeto de potássio como eluente para espécie. Apesar de a espécie alvo começar a eluir após cerca de 8 minutos, observa-se imensa cauda indicando que este ânion eluente ( $I^-$ ) não consegue minimizar suficientemente o efeito de interação forte do analito com a fase estacionária. Este efeito foi observado independentemente da concentração da solução de selenocianato injetada na coluna (o perfil abaixo poderia estar associado à injeção de uma solução muito concentrada: saturação da coluna). A utilização de tiocianato como eluente foi descartada devido a indisponibilidade deste reagente com grau de pureza satisfatório em nosso laboratório.

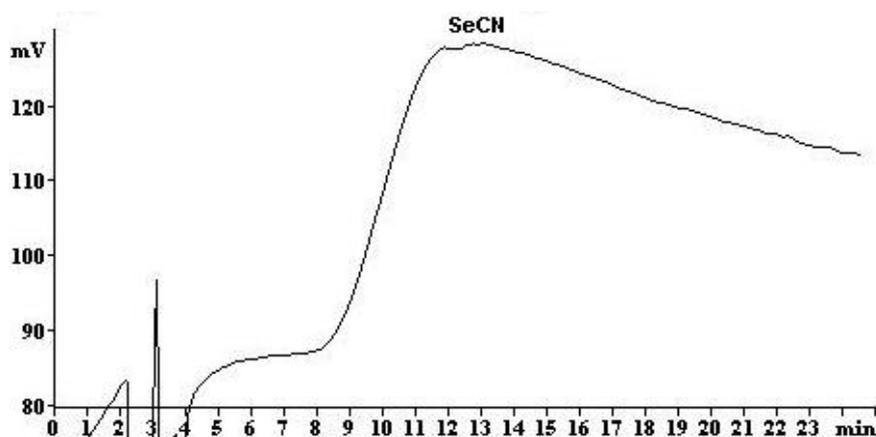


Figura 30 - Cromatograma de selenocianato utilizando detecção amperométrica (Condições experimentais: eluente iodeto de potássio 5 mM, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, coluna Metrosep A Supp1).

A Figura 31 mostra o efeito da introdução do ânion perclorato ao eluente AC. Nestes primeiros ensaios, optou-se pela retirada de acetonitrila do eluente para investigar a influência individual deste ânion ( $ClO_4^-$ ). Nas figuras seguintes, trabalhou-se com AC 15 mM e variou-se a concentração de perclorato de 1 mM a 3 mM. As demais condições (vazão do eluente e tipo de coluna) são similares às separações anteriores.

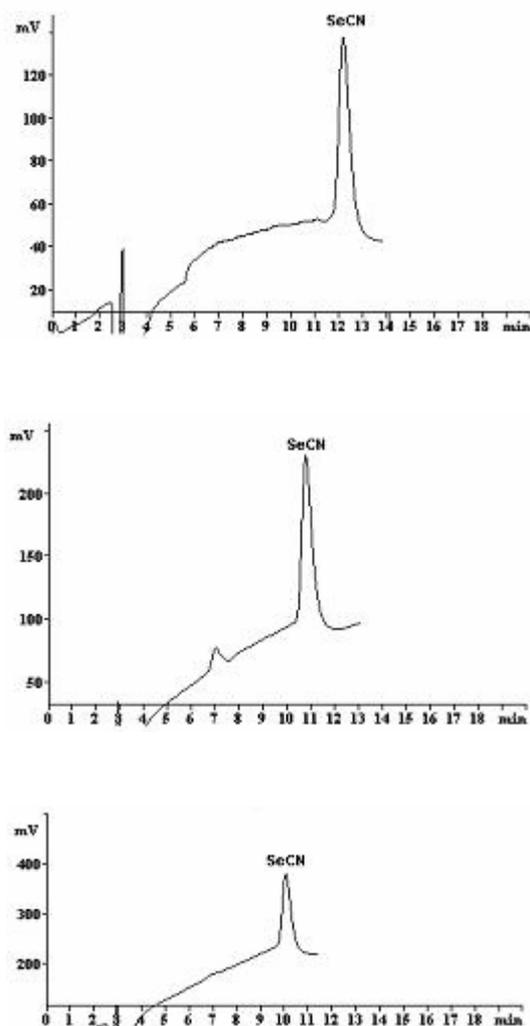


Figura 31-Cromatograma de selenocianato mostrando o efeito da adição de perclorato ao eluente AC (15 mM). Concentração de  $\text{ClO}_4^-$  na Fig. superior - 1mM; Fig. intermediária - 2 mM e Fig. inferior - 3 mM; vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1).

A Figura 31 indica claramente que a presença de perclorato no eluente desfavorece as interações de ordem secundária de  $\text{SeCN}^{-1}$  com a fase estacionária em estudo. Ainda havia a possibilidade de um aumento da vazão do eluente e do retorno de acetonitrila ao eluente. Para confirmar definitivamente este efeito, elevou-se a concentração de perclorato até 10 mM, observando-se pela primeira vez um estreitamento considerável dos picos da espécie em estudo (Figura 32).

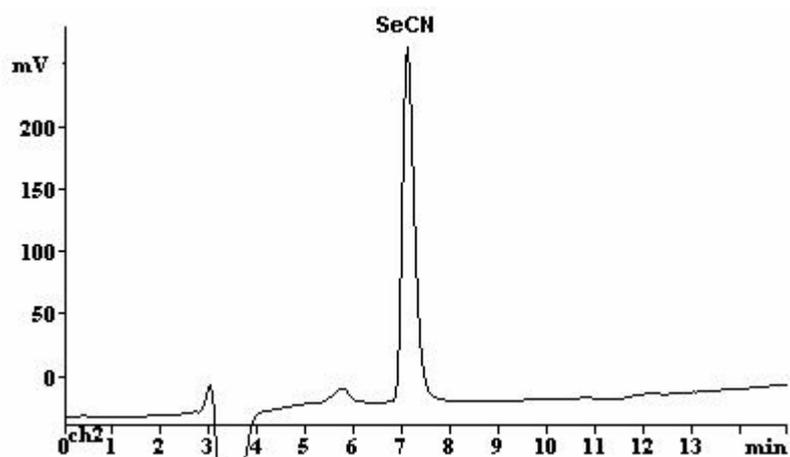


Figura 32 - Cromatograma de selenocianato mostrando o efeito da adição de perclorato ao eluente AC (15 mM). Concentração de  $\text{ClO}_4^-$ : 10 mM; vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1).

A Figura 33 mostra o efeito da presença de um outro ânion (citrato) ao eluente cianúrico. Porém, o esperado efeito de melhora no formato de pico não ocorreu em extensão apreciável quando comparado aos resultados obtidos pelo emprego de perclorato. O ânion citrato atua, principalmente, na interação primária (competição entre os íons do eluente e íons do analito pelo sítio trocador carregado positivamente) e em menor grau, nas interações de ordem secundária.

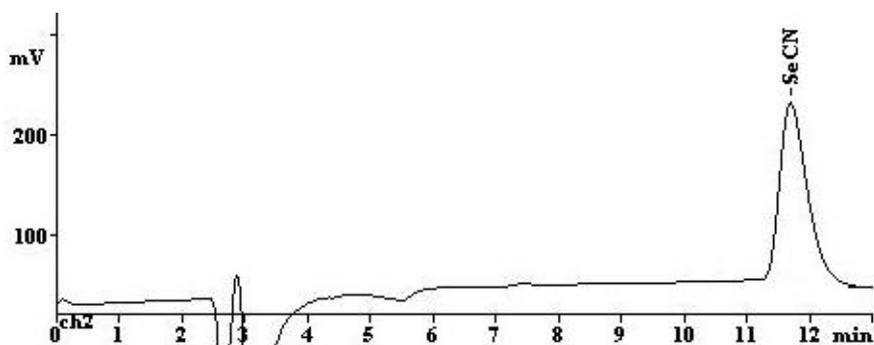


Figura 33 - Cromatograma de selenocianato na presença de 5 mM do ânion citrato, (pH = 12) no eluente AC (18mM). Outras condições como nas figuras anteriores.

A partir deste ponto da etapa de otimização, concluiu-se que o caminho que levaria a uma separação rápida e com boa resolução passaria pelo encontro de uma composição adequada de eluente em termos de AC, perclorato e acetonitrila. Os efeitos individuais, e às vezes em combinação, destes três componentes foram investigados nos ensaios mostrados anteriormente neste capítulo. Ficou definido também que a continuidade do processo de otimização se daria trabalhando-se com um sistema hifenado (IC-ICPMS) devido à necessidade de investigação simultânea do comportamento das três espécies de interesse neste estudo. Conforme mostrado anteriormente, pelo menos para as condições de trabalho aqui estabelecidas, são eletroquimicamente inativas as espécies selenito e selenato.

### 5.3. Otimização da separação entre selenito, selenato e selenocianato utilizando cromatografia iônica acoplada a ICPMS

Na seção 5.1 foi mencionada a ineficiência do uso de eluente carbonato para o deslocamento da espécie da coluna de separação. A Figura 34 mostra, que apesar da utilização de alta concentração do eluente (50 mM), é inviável o emprego deste íon como eluente para a espécie investigada. A inviabilidade é representada em termos de tempo de análise, formato de pico e alta salinidade do eluente. Selenito e selenato mostram boa separação, entretanto, o sinal referente ao selenocianato é obtido apenas após cerca de 45 minutos de corrida.

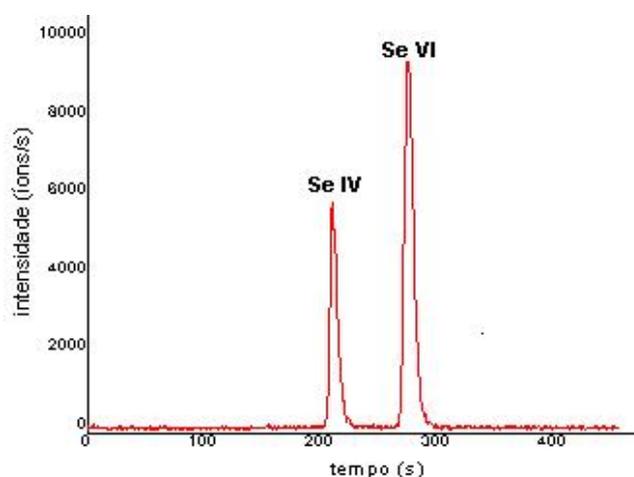


Figura 34 - Separação de selenito e selenato com o eluente carbonato (50 mM) e detecção por ICPMS. A terceira espécie injetada, selenocianato, não foi eluída durante a corrida. (Condições experimentais: vazão  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna Metrosep A Supp1).

O *software* que gerencia a aquisição de dados do equipamento utilizado (ELAN 5000A, Perkin Elmer Sciex) não possibilita a alteração do tempo de duração da corrida cromatográfica depois de iniciado o processo de registro das intensidades dos sinais transientes. No caso acima, a solução injetada na coluna continha as três espécies inorgânicas de selênio de interesse. Após término da corrida, não tendo sido registrado nenhum sinal relativo a selenocianato, simulou-se uma nova injeção pelo recomeço do processo de aquisição de dados. A bomba isocrática permaneceu em funcionamento. Na Figura 35 é possível observar a saída de selenocianato da coluna depois de tempo equivalente a 45 minutos.

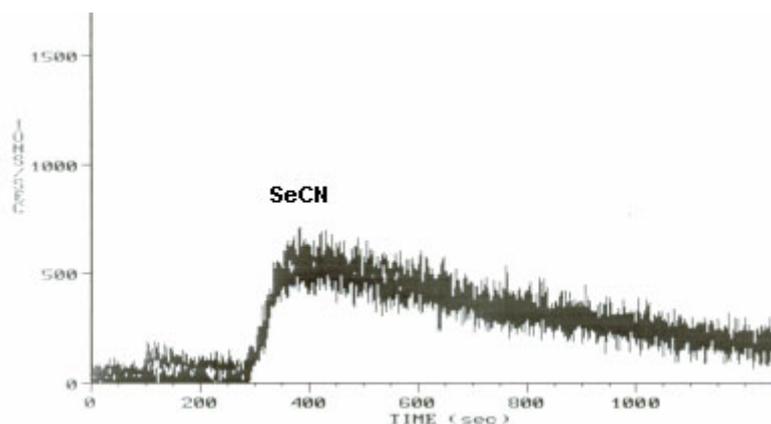


Figura 35 - Cromatograma de selenocianato (continuação do cromatograma da Figura 34). O sinal é referente à quarta corrida e em cada uma delas, a duração foi de 12 min. (Outras condições experimentais como na Figura 34).

Em seguida são mostrados os primeiros cromatogramas obtidos pelo emprego de eluentes baseados em AC, utilizando-se ICPMS como detector. Inicialmente, os testes começaram a ser realizados com vazão de eluente de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , adequado ao nebulizador concêntrico utilizado (Meinhard). Os primeiros ensaios evidenciaram que o perfil de separação, invariavelmente, era caracterizado pela pobre resolução na região inicial do cromatograma e pela eluição de selenocianato em tempos entre 10 a 15 minutos.

Qualquer tentativa de melhorar a resolução entre selenito e selenato comprometia o parâmetro tempo de análise, aumentando-se significativamente o tempo de retenção da espécie. Um aumento da vazão do eluente, da concentração de AC ou da concentração de perclorato fatalmente comprometia a resolução entre selenito e selenato, obtendo-se como resultado, sobreposição dos dois primeiros picos. Vale mencionar que nos primeiros ensaios foram preparados eluentes que não continham acetonitrila como modificador orgânico. Apesar de ter sido mostrado (pelos ensaios no cromatógrafo de íons) o efeito deste componente no comportamento de retenção da espécie fortemente retida, inicialmente optou-se pela elaboração de sistemas eluentes livres deste aditivo, devido aos possíveis obstáculos decorrentes da presença de alta carga de solvente orgânico para a estabilidade do plasma. Porém, em vista do perfil repetidamente obtido nas

separações, decidiu-se retomar os testes com a presença de acetonitrila no eluente. Será mostrado que uma combinação adequada de ânions cianurato, ânions perclorato e acetonitrila, tornou possível uma separação satisfatória e rápida entre as espécies de interesse (7,5 minutos). A Figura 36 mostra o perfil de separação obtido pelos ensaios iniciais.

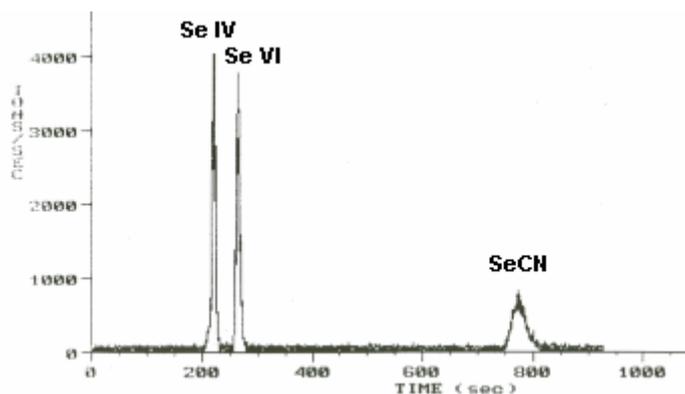


Figura 36 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 10 mM, perclorato 1 mM, ausência de acetonitrila; outras condições como na Figura 34).

A Figura 37 ilustra a problemática da separação cromatográfica em questão. Este resultado sugeria a necessidade de trabalhar-se inicialmente com um eluente para a eluição dos dois primeiros picos e após cerca de 300 segundos, alternar para uma composição mais direcionada ao deslocamento da terceira espécie. No entanto, antes desta alternativa, buscava-se por uma separação em condição isocrática sem a troca da composição do eluente durante a corrida. Em publicação recente (Wallschlager e Roehl, 2001) é possível observar a necessidade de inclusão de uma etapa de reequilíbrio da coluna de separação entre uma injeção e outra, tornando mais longo o tempo de análise. Na Figura 37 as condições de separação são idênticas as da Figura 36, exceto a concentração de perclorato que foi elevada até 2 mM.

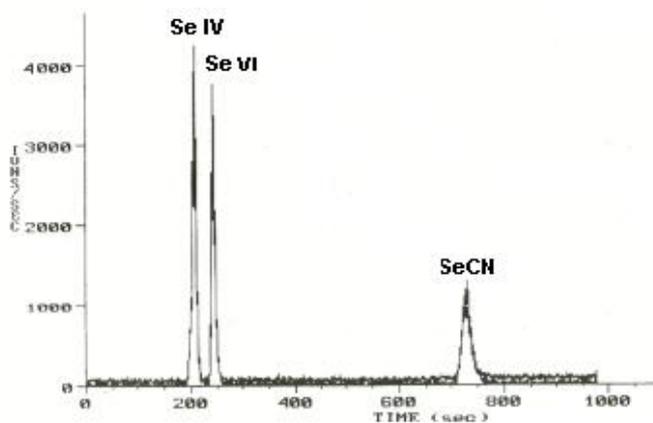


Figura 37 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 10 mM, perclorato 2 mM, ausência de acetonitrila; outras condições como na Figura 34).

Nota-se que a elevação na concentração de perclorato reduz ligeiramente o tempo de retenção de selenocianato e melhora o formato do pico. Na Figura 38 a concentração de perclorato é elevada a 3mM, o que representa a concentração possível máxima deste modificador, pois para maiores concentrações de perclorato os dois primeiros picos coeluem.

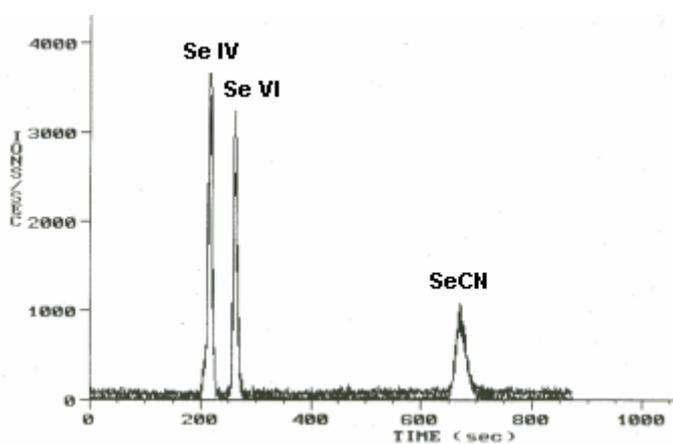


Figura 38 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 10 mM, perclorato 3 mM, ausência de acetonitrila; outras condições como na Figura 34).

Por esta razão, foi mantida constante e em 3 mM a concentração de perclorato nas seguintes experiências, e reduzida a concentração de ácido cianúrico (Figura 39). Observou-se discreta melhora na resolução entre selenito e selenato e um aumento nos tempos de retenção para as três espécies. O formato de

pico para selenocianato permaneceu semelhante, sugerindo, conforme os resultados obtidos na etapa de otimização no cromatógrafo de íons, que os ânions cianurato atuam predominantemente no “tempo de retenção”, enquanto que os ânions perclorato contribuem no melhoramento do “formato de pico”.

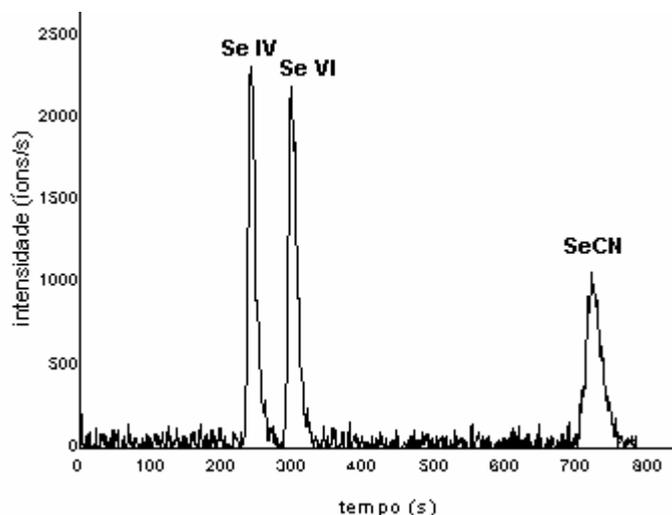


Figura 39 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 10 mM, perclorato 5 mM, ausência de acetonitrila; outras condições como na Figura 34).

A introdução de acetonitrila ao eluente (Figura 40) e a concomitante redução da concentração de AC a 3 mM resultou em um efeito desejável. Aumentou-se sobremaneira a resolução entre selenito e selenato na região inicial do cromatograma. Nota-se o aumento significativo do tempo de retenção para as duas primeiras espécies e, no entanto, manteve-se praticamente inalterado o tempo de retenção para selenocianato. O atraso no deslocamento de selenocianato (pela redução da concentração de AC) foi compensado pela presença de acetonitrila no eluente.

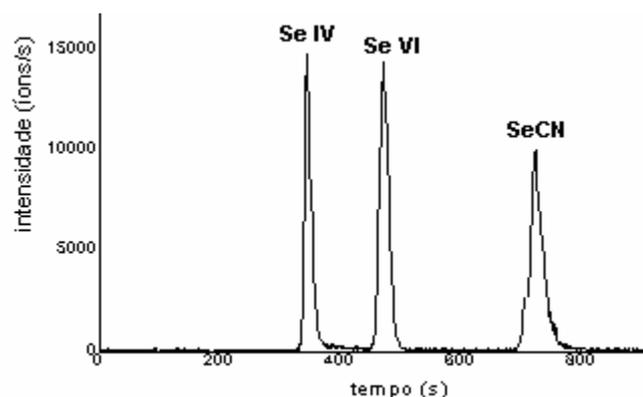


Figura 40 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 3mM, perclorato 3mM, acetonitrila 2,5 %; outras condições como na Figura 34).

O resultado acima (Figura 40) abriu o precedente para manipular um parâmetro que até então não poderia ser explorado. Com o ganho de resolução conseguido, foi possível testar o aumento da vazão do eluente. Para a vazão testada nos ensaios anteriores ( $1\text{ mL min}^{-1}$ ), a pressão do sistema era tipicamente 690 psi, ainda consideravelmente inferior aos limites de pressão recomendados pelo fabricante da coluna (2400 psi). Vazões de até  $2\text{ mL min}^{-1}$  podem ser estabelecidas em trabalhos com a Metrosep A Supp1. Na Figura 41 é mostrado o efeito do aumento da vazão do eluente com as demais condições cromatográficas idênticas a da Figura 40.

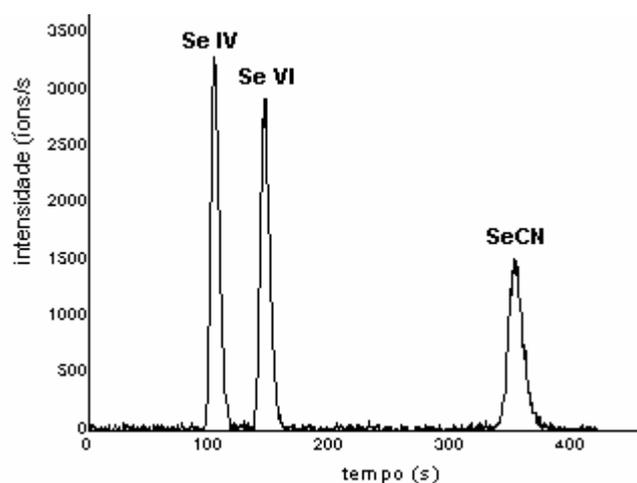


Figura 41 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS. (AC 3mM, perclorato 3mM, acetonitrila 2,5 %; vazão do eluente de  $1,5\text{ mL min}^{-1}$ . Observar o tempo de retardo (*delay*) de 100 segundos.

A Tabela 8 reúne os mais importantes parâmetros de separação da metodologia otimizada.

Tabela 8 - Descrição dos sistemas cromatográficos e de detecção otimizados para especificação de compostos inorgânicos de selênio.

<u>Sistema cromatográfico</u>	
Coluna	Metrosep A Supp1
Eluente	AC 3 mM; perclorato 2.5 mM; ACN 2%
Vazão da bomba	1.5 mL min <sup>-1</sup>
Pressão do sistema	820 psi
Volume de amostra	500 µL
Volume morto	105s
<u>Sistema de detecção</u>	
ICPMS	ELAN 5000A
Nebulização	Meinhard com câmara ciclônica

Fator de capacidade ( $K'$ ) é um parâmetro adequado para caracterização dos componentes de um cromatograma, pois, diferentemente do parâmetro tempo de retenção, não depende da vazão do eluente ou comprimento da coluna. Componentes com baixos valores de  $K'$  eluem nas imediações do volume morto e, geralmente, é pobre a resolução neste segmento do cromatograma. Valores de  $K'$  muito grandes levam a fenômenos de alargamento de pico, baixa sensibilidade e longos tempos de análise. Na prática, boas separações são conseguidas para valores de  $K'$  entre 1 e 5.

O fator de capacidade ( $K'$ ) é dado pela seguinte expressão:

$$K' = T'_R / T_o = (T_R - T_o) / T_o = (T_R/T_o) - 1$$

Onde:

$K'$  - fator de capacidade

$T_R$  - Tempo de retenção

$T_o$  - tempo morto

$T'_R$  - tempo de retenção ajustado ( $T_R - T_o$ )

Neste trabalho, os fatores de capacidade para a condição otimizada (Tab. 7) e para as três espécies de interesse (em seqüência de eluição) foram, respectivamente: 1,0; 1,5 e 2,3. Em termos práticos, se uma espécie possui  $K'$  de valor 1, isto significa que seu tempo de retenção é o dobro do tempo morto. Na Tabela 9 encontram-se as figuras de mérito obtidas pela técnica IC-ICPMS para especiação de selenito, selenato e selenocianato. Os tempos de retenção foram 210 segundos para selenito, 250 segundos para selenato e 350 segundos para selenocianato nas condições otimizadas, conforme mostrado pela Tabela 7.

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho do procedimento otimizado para especiação de compostos de selênio por IC-ICPMS. Condições experimentais: coluna Metrosep A Supp1, eluente AC 3mM, perclorato 2,5mM e acetonitrila 2%, vazão da bomba de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, pressão no sistema de 820psi e alça de amostragem de 500 µL.

Figuras de Mérito	Se (IV)	Se (VI)	SeCN <sup>-1</sup>
Faixa de trabalho investigada (ng mL <sup>-1</sup> )	0 – 50	0 – 50	0 – 50
Coefficiente de correlação (r <sup>2</sup> )	0.9981	0.9996	0.9971
Repetitividade em tempos de retenção *	0.5%	0.6%	0.8%
Repetitividade em área de pico - (injeção de 1ng)*	2.1%	2.9%	3.1%
Limite de detecção (3σ), medidas em área de pico, para alça de 500µL** (µg L <sup>-1</sup> )	0.08	0.11	0.18

\* Calculados pelo desvio padrão de 10 replicatas de um padrão de 2µg L<sup>-1</sup>. \*\* As áreas de pico relativamente ao branco foram calculadas no segmento do cromatograma onde eluem os picos.

#### **5.4. Controle de qualidade das medições realizadas por IC-ICPMS.**

Diferentes recursos podem ser utilizados com a finalidade de se garantir a confiabilidade dos resultados aqui produzidos. A própria especificidade do detector de massa é um fator fundamental que possibilita a detecção de um isótopo de interesse, mesmo que ocorram eventos de coeluição. Medidas de recuperação percentual do(s) analito(s) a partir de amostras fortificadas é outra medida de controle de qualidade, especialmente valiosa quando não se dispõe de materiais de referência certificados (MRCs). O próprio tempo de retenção (ou K'), uma vez bem caracterizado, é outro meio para se certificar da confiabilidade de um resultado cromatográfico. Para o caso de elementos que possuem mais de um isótopo estável, um recurso adicional é o monitoramento concomitante de dois ou mais isótopos. O conhecimento da abundância isotópica natural de cada isótopo individual e a medição de área de pico correspondente a cada um deles podem ser explorados para investigar a eventualidade de interferências espectrais. Neste estudo, monitoraram-se três isótopos de selênio ( $^{77}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$  e  $^{82}\text{Se}$ ). Os resultados deste tratamento a cada pico, obtidos na etapa de aplicação da metodologia às amostras de efluentes, serão apresentados posteriormente.

Para monitorar a estabilidade das medições ao longo de uma corrida cromatográfica, a técnica do padrão interno é valiosa. Foi adotado o seguinte arranjo: ao efluente da coluna de separação foi adicionada uma solução de padrão interno ( $^{115}\text{In}$ ) através de uma conexão em "T". Como resultado, não foram observadas quedas ou aumentos de sinais do padrão interno durante as análises realizadas, e desta maneira, os resultados podiam ser processados sem alguma espécie de compensação. Houve exceção para algumas das amostras muito salinas, porém, a perturbação no sinal do padrão interno foi percebida apenas na região do volume morto, tendo ocorrido, surpreendentemente, uma elevação do sinal, ainda não bem compreendida. A Figura 42 mostra um registro típico do sinal do padrão interno observado durante as análises.

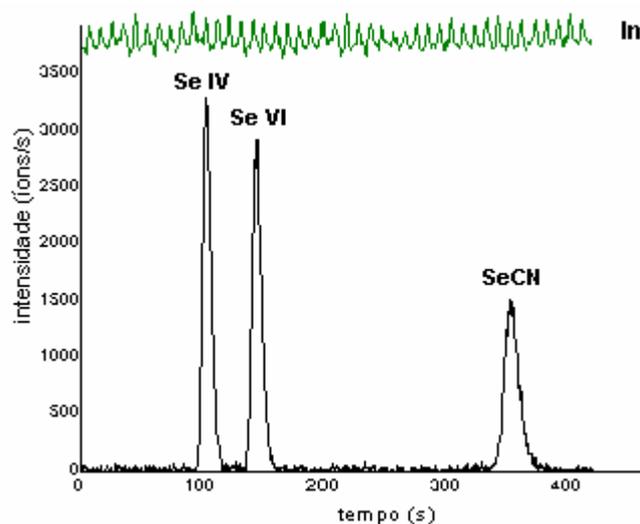


Figura 42 - Registro da intensidade do sinal de  $^{115}\text{In}$  utilizado como padrão interno, com concentração de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  (vazão da bomba auxiliar de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ )

Na Figura 43 são mostrados, apenas para efeito de confirmação qualitativa, dois cromatogramas. Na Figura 43a, as espécies foram detectadas pelo sistema IC-ICPMS com as condições cromatográficas resumidos na Tabela 7. Na Figura 43b, foi utilizado o detector amperométrico do cromatógrafo de íons. As condições para a Figura 43b são idênticas as da Tabela 7, com exceção do detector e da concentração dos analitos injetados. Observa-se uma diferença de cerca 10 vezes entre as sensibilidades dos dois detectores, pelo menos para as condições utilizadas. Detectores amperométricos são conhecidos por apresentarem boa seletividade e sensibilidade. A razoável detectabilidade da espécie selenocianato pelo detector eletroquímico sugere que se busque condições ótimas para melhor a sensibilidade, se o interesse for a sua utilização. Casella et al. (1998) mencionaram a alta dependência da sensibilidade em detecções amperométricas com a vazão do eluente, o que pode estar associado à modesta sensibilidade obtida.

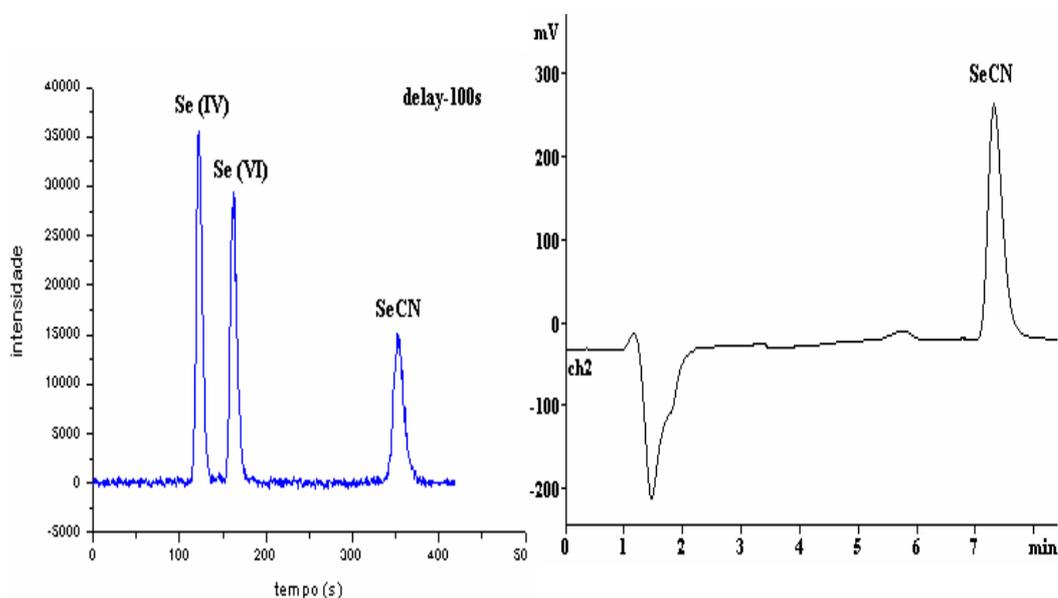


Figura 43 - Cromatogramas obtidas com duas técnicas diferentes de detecção: a) ICPMS, concentração das espécies:  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ; b) amperometria, concentração das espécies:  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ . Condições cromatográficas vide Tabela 7. Observar o tempo de retardo de 100 s na Fig. 43a.

Na Figura 44 mostra-se o emprego do sistema de nebulização ultrassônica (USN) para introdução da amostra no plasma. Neste sistema, é maior a eficiência de transporte do analito, que pode chegar a 30% em comparação ao cerca de 1% observado com o nebulizador concêntrico comum. Além disso, a dessolvatação que ocorre no USN pode melhorar a ionização do analito no plasma e reduzir interferências de óxidos, se for o caso. Infelizmente, as potenciais vantagens do USN não foram confirmadas neste estudo para o selênio. Observou-se um aumento proporcional do fundo que compensava o ganho do sinal analítico, proporcionando razões sinal/fundo semelhantes às observadas com o sistema pneumático. Além disso, constatou-se uma piora na repetitividade das medições.

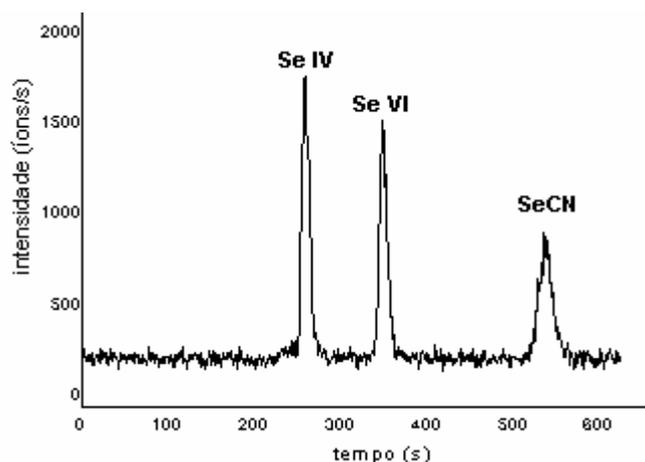


Figura 44 - Cromatograma mostrando a separação das três espécies de selênio detectadas por ICPMS (utilização de nebulização ultrasônica) - AC 3mM, perclorato 3mM, acetonitrila 2,5 %; vazão do eluente de 1,5 mL min. Observar o tempo de retardo (*delay*) de 100 segundos. Neste ensaio foi utilizada uma alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$  e a concentração das espécies de selênio foi de 5  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Conforme mencionado no capítulo 4, o AC utilizado como eluente foi oriundo de um produto disponível no comércio com aplicação específica (estabilização de cloro em águas de piscinas). Esta opção foi decorrente da impossibilidade de obtenção deste reagente em tempo reduzido, tendo em vista a indisponibilidade de pronta entrega pelos fabricantes de produtos químicos representados no Brasil. As medidas de condutividade após supressão química e a análise multielementar por ICPMS (pelo modo semiquantitativo - TotalQuant) de uma solução preparada com o reagente purificado mostraram a alta pureza do reagente após procedimento de recristalização em água quente. Os dados abaixo foram registrados durante a etapa de otimização no trabalho com o cromatógrafo de íons.

Condutividade típica de NaOH 5 mM após supressão – 6  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

Condutividade típica de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5mM após supressão – 15  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

Condutividade de AC 5 mM após supressão – 6,5  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .