



Dissertação de Mestrado

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS

Fábio Andrei Duarte

PPGQ

Santa Maria, RS - Brasil

2006

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES ARSÊNIO POR LC-ICP-MS

por

Fábio Andrei Duarte

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Santa Maria, RS - Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS

elaborada por

Fábio Andrei Duarte

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Valderi Luiz Dressler - Orientador (UFSM-RS)

Dra. Maria de Fátima Batista de Carvalho (PETROBRÁS/CENPES-RJ)

Dr. Renato Zanella (UFSM-RS)

Santa Maria, 28 de julho de 2006.

Dedico este trabalho, aos meus pais *Luiz e Vera*, à minha irmã, *Aline*, à minha noiva, *Juliana*, pelo amor, amizade, carinho, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela orientação, amizade, apoio, incentivo e pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela amizade, pelas inúmeras contribuições e pelo apoio durante a elaboração deste trabalho.

À Dra. **Maria de Fátima Batista de Carvalho**, pelas sugestões e contribuições como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. **Renato Zanella**, pela participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À **Embrapa - Clima Temperado** por ceder as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos professores e colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, pela amizade, incentivo e companheirismo demonstrados. Agradeço, em especial, à Juliana, pela colaboração direta no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	<i>ix</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>x</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>xiv</i>
RESUMO.....	<i>xviii</i>
ABSTRACT.....	<i>xix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ARSÊNIO.....	3
2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO.....	7
2.2.1. Análise de especiação de arsênio.....	8
2.3. AMOSTRAGEM, PRESERVAÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS.....	9
2.3.1. Amostras sólidas.....	10
2.3.2. Amostras líquidas.....	12
2.4. TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E DETECÇÃO.....	17
2.4.1. Técnicas de separação.....	17
2.4.1.1. Cromatografia a gás.....	17
2.4.1.2. Cromatografia a líquido de alta eficiência com fase reversa.....	19
2.4.1.3 Cromatografia por par iônico.....	20
2.4.1.4. Cromatografia por exclusão.....	22
2.4.1.5. Eletroforese capilar.....	22
2.4.2. Técnicas de detecção.....	24
2.4.2.1. Espectrometria de absorção atômica.....	24
2.4.2.2. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.....	25
2.4.2.3. Espectrometria com geração de hidretos.....	26
2.4.2.4. Espectrometria de massa.....	27

2.4.2.5. Espectrofotometria.....	28
2.4.2.6. Métodos eletroanalíticos.....	28
2.5. CROMATOGRAFIA DE ÍONS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO.....	29
2.5.1. Cromatografia de íons.....	30
2.5.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	31
2.5.3. Especificação de arsênio empregando LC-ICP-MS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	40
3.2. REAGENTES.....	41
3.3. MATERIAIS DIVERSOS.....	42
3.4. AJUSTE DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO INSTRUMENTO DE ICP-MS.....	43
3.5. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS.....	44
3.5.1. Escolha da vazão e concentração da fase móvel.....	45
3.5.2. Separação e identificação das espécies de arsênio.....	45
3.5.3. Estudo da influência do pH da fase móvel.....	45
3.5.4. Estudo da influência da vazão da fase móvel.....	46
3.5.5. Estudo da influência da concentração da fase móvel.....	46
3.5.6. Condicionamento da coluna cromatográfica.....	46
3.6. AMOSTRA.....	46
3.6.1. Tratamento preliminar da amostra.....	47
3.6.2. Caracterização da amostra.....	47
3.6.3. Análise de especificação de arsênio.....	47
3.6.3.1. Estudo de interferências espectrais na determinação de arsênio por LC-ICP-MS.....	48
3.6.3.2. Validação do método proposto para análise de especificação de arsênio.....	49
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	50
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO SUBPRODUTO AQUOSO DO PROCESSO DE PIRÓLISE DO FOLHELHO BETUMINOSO.....	50
4.2. AJUSTE DO SISTEMA LC-ICP-MS.....	52

4.2.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS.....	52
4.2.2. Escolha da vazão e concentração da fase móvel.....	53
4.2.3. Identificação das espécies de arsênio.....	56
4.2.4. Influência do pH da fase móvel.....	57
4.2.5. Ajuste da vazão da fase móvel.....	60
4.2.6. Ajuste da concentração da fase móvel.....	62
4.2.7. Condicionamento da coluna cromatográfica.....	65
4.2.8. Estudo de interferências espectrais na determinação de arsênio por LC-ICP-MS.....	66
4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM SUBPRODUTO AQUOSO DO PROCESSO DE PIRÓLISE DO FOLHELHO BETUMINOSO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições de operação do instrumento de ICP-MS.....	44
Tabela 2.	Propriedades físico-químicas do subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso <i>in natura</i>	50
Tabela 3.	Resultados da determinação de elementos majoritários e minoritários do subproduto aquoso sem pré-tratamento e após etapas de centrifugação e filtração.....	51
Tabela 4.	Resultados obtidos na determinação de arsênio total por ICP-MS, ICP OES e GF AAS.....	52
Tabela 5.	Características gerais do programa de eluição após otimização das condições. Vazão da fase móvel ((NH ₄) ₂ CO ₃) de 1,5 ml min ⁻¹ e em pH 8,7...	65
Tabela 6.	Resultados obtidos para as espécies de arsênio no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, diluída 10 vezes em (NH ₄) ₂ CO ₃ 0,0015 mol l ⁻¹	68
Tabela 7.	Tempo de retenção das espécies de arsênio presentes no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.....	70
Tabela 8.	Limites de detecção e tempos de retenção obtidos para as diferentes espécies de As.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biogeoquímico do arsênio (adaptado de Wood ¹³).....	6
Figura 2.	Estrutura química dos compostos de arsênio mais comuns no ambiente.....	7
Figura 3.	Esquema de um instrumento de ICP-MS. 1. sistema de introdução de amostra; 2. tocha e plasma; 3. interface e 4. espectrômetro de massa.....	32
Figura 4.	Vista detalhada da tocha, plasma e interface. 1. tubo externo; 2. tubo intermediário e 3. tubo injetor.....	33
Figura 5.	Esquema do sistema LC-ICP. 1. fase móvel; 2. degaseificador a vácuo; 3. bomba de LC; 4. injetor; 5. coluna guarda (troca aniônica); 6. coluna analítica (troca aniônica); 7. tubos de PEEK; 8. nebulizador; 9. câmara de nebulização e 10. plasma.....	40
Figura 6.	Procedimento geral do preparo da amostra para a determinação da concentração total e análise de especiação de arsênio no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.....	48
Figura 7.	Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo As(III), As(V), DMA, <i>p</i> -ASA e AsB, na concentração de 50 µg l ⁻¹ (como As) de cada espécie, com injeção de 200 µl. Eluição isocrática a pH 8,5 e vazão da fase móvel de 0,8 ml min ⁻¹ . Programa de eluição: 7 min a 0,015 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃ e 23 min a 0,05 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃	54
Figura 8.	Influência da concentração e vazão da fase móvel na separação das espécies de As. (a) vazão de 0,8 ml min ⁻¹ e (b) vazão de 1,4 ml min ⁻¹ . Injeção de 200 µl de solução mista contendo 10 µg l ⁻¹ (como As) das espécies AsB, As(III), DMA, <i>p</i> -ASA e As(V) e eluição isocrática em pH 8,5. Programa de eluição: 7 min a 0,003 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃ e 23 min a 0,01 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃ ; (c) vazão de 0,8 ml min ⁻¹ e (d) vazão de 1,4 ml min ⁻¹ com programa de eluição: 7 min a 0,0015 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃ e 23 min a 0,005 mol l ⁻¹ de (NH ₄) ₂ CO ₃	55

- Figura 9.** Cromatogramas obtidos a partir de (a) uma solução mista de As(III), As(V), DMA, *p*-ASA e AsB, com concentração de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de cada espécie; (b) solução de referência de AsB; (c) solução de referência de As(III); (d) solução de referência de DMA; (e) solução de referência de *p*-ASA; (f) solução de referência de As(V). Eluição isocrática em pH 8,5 e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de cada solução..... 57
- Figura 10.** Efeito do pH da fase móvel na separação das espécies. (a) pH 7; (b) pH 8; (c) pH 9; (d) pH 10. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V)..... 58
- Figura 11.** Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de arsênio. (a) pH 8,6 e (b) pH 8,8. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V)..... 59
- Figura 12.** Efeito da vazão da fase móvel na separação das espécies de arsênio. (a) $0,8 \text{ ml min}^{-1}$; (b) $1,0 \text{ ml min}^{-1}$; (c) $1,2 \text{ ml min}^{-1}$; (d) $1,4 \text{ ml min}^{-1}$; (e) $1,6 \text{ ml min}^{-1}$. Eluição isocrática em pH 8,7 com o programa: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 18 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V) 60
- Figura 13.** Cromatograma obtido a partir da amostra de subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso nas condições previamente otimizadas. (a) amostra centrifugada, filtrada e sem diluição; (b) cromatograma (a) ampliado 50 vezes. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 18 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, ambos em pH 8,7. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de amostra..... 61

- Figura 14.** Cromatograma obtido quando a eluição é feita em duas etapas. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 7 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 13 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução de referência mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V)..... 62
- Figura 15.** Efeito da concentração da fase móvel na segunda etapa da eluição sobre a separação das espécies de arsênio. Sendo (a) 0,005 mol l⁻¹; (b) 0,01 mol l⁻¹; (c) 0,015 mol l⁻¹ a concentração da fase móvel na segunda etapa da eluição. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução de referência mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V)..... 63
- Figura 16.** Cromatograma obtido a partir do subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso. Injeção de 200 µl da amostra diluída 10 vezes, onde (a) corresponde à amostra centrifugada e filtrada e diluída em (NH₄)₂CO₃ 0,0015 mol l⁻¹; (b) cromatograma (a) ampliado 40 vezes. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃, 10 min a 0,012 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃..... 64
- Figura 17.** Influência do tempo de condicionamento da coluna sobre o tempo de retenção das espécies. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃, 10 min a 0,012 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução de referência mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V)..... 65
- Figura 18.** Influência do Cl⁻ (⁴⁰Ar³⁵Cl⁺, m/z 75) na determinação de arsênio (⁷⁵As⁺) por LC-ICP-MS. Injeção de solução com (a) 10 mg l⁻¹, (b) 100 mg l⁻¹, (c) 1000 mg l⁻¹ e (d) 5000 mg l⁻¹ de Cl⁻. Eluição isocrática com vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹, em pH 8,7. Programa de eluição: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃, 10 min a 0,012 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃..... 67

Figura 19. Cromatograma obtido a partir da amostra diluída 10 vezes em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (a) e (b) cromatograma (a) ampliado 80 vezes. Cromatograma em preto é referente à amostra diluída 10 vezes, enquanto que o cromatograma em vermelho corresponde a amostra diluída 10 vezes com adição de $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de As(III), $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de DMA, $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de *p*-ASA e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de As(V). Eluição isocrática com vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, em pH 8,7. Programa de eluição: 10 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 10 min a $0,012 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 10 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*
- AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *atomic fluorescence spectrometry*
- As(III), arsenito
- As(V), arsenato
- As, arsênio
- AsB, arsenobetaína
- AsC, arsenocolina
- ASE, extração acelerada com solvente, do inglês *accelerated solvent extraction*
- C₁₈, grupos octadecil imobilizados sobre sílica
- ca, corrente alternada, do inglês *alternate current*
- cc, corrente contínua, do inglês *continuous current*
- CE, eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*
- CE-ICP-MS, eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry*
- cps, contagens s⁻¹
- CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference materials*
- CVG, geração química de vapor, do inglês *chemical vapor generation*
- CZE, eletroforese capilar de zona, do inglês *capillary zone electrophoresis*
- d.i., diâmetro interno
- cc, corrente contínua
- DMA, ácido dimetilarsônico, do inglês *dimethylarsinic acid*
- DQO, demanda química de oxigênio
- ECD, detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*
- EDTA, ácido etilenodiaminotetracético
- Eh, potencial redox
- EOF, fluxo eletrosmótico, do inglês *electroosmotic flow*
- ES-MS, espectrometria de massa com ionização por electrospray, do inglês *electrospray mass spectrometry*
- ES-MS-MS, espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray, do inglês *tandem electrospray mass spectrometry*

- ETV, vaporização eletrotérmica, do inglês *electrothermal vaporization*
- F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*
- FI, injeção em fluxo, do inglês *flow injection*
- FID, detector por ionização em chama, do inglês *flame ionization detector*
- FI-HG AFS, injeção em fluxo com geração de hidretos e detecção por espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *flow injection-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry*
- FPD, detector fotométrico de chama, do inglês *flame photometric detector*
- GC, cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography*
- GC-MS, espectrometria de massa acoplada à cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*
- GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- GLP, gás liquefeito de petróleo
- HG, geração de hidretos, do inglês *hydride generation*
- HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation atomic absorption spectrometry*
- HG AFS, espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation-atomic fluorescence spectrometry*
- HG-LT-GC-ICP-MS, geração de hidretos acoplada à cromatografia a gás a baixa temperatura com detecção com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *hydride generation-low temperature-gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*
- HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
- HPLC-ES-MS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por electrospray, do inglês *high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*
- HPLC-HG AFS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos, do inglês *high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry*
- HPLC-ICP OES, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *high-*

performance liquid chromatography-inductively coupled plasma optical emission spectrometry

HPLC-ICP-MS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*

HPLC-UV-HG AAS, cromatografia a líquido de alta eficiência com oxidação por ultravioleta acoplada a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *high-performance liquid chromatography-ultraviolet-hydride generation atomic absorption spectrometry*

IC, cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*

IC-ICP-MS, cromatografia de íons com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP OES, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

IUPAC, *international union of pure and applied chemistry*

LC, cromatografia a líquido, do inglês *liquid chromatography*

LC-ES-MS, cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray, do inglês *liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*

LC-ICP-MS, cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*

LD, limite de detecção

LQ, limite de quantificação

LT-GC, cromatografia a gás a baixa temperatura, do inglês *low temperature-gas chromatography*

M⁺, íon monovalente

M²⁺, íon divalente

m/z, razão massa/carga

MMA, ácido monometilarsênico, do inglês *monomethylarsonic acid*

MO⁺, íon óxido

MS, espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*
MS-MS, espectrometria de massa em tandem, do inglês *tandem mass spectrometry*
OD, oxigênio dissolvido
PAA, ácido fenilarsônico, do inglês *phenylarsonic acid*
p-ASA, ácido *p*-arsanílico, do inglês *p-arsanilic acid*
PEEK, poliéter éter cetona, do inglês *polyetheretherketone*
PFPD, detector fotométrico de chama pulsada, do inglês *pulsate flame photometric detector*
PLE, extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized liquid extraction*
PN, nebulização pneumática, do inglês *pneumatic nebulization*
PTFE, politetrafluoretileno
RF, radiofrequência, do inglês *radiofrequency*
RP-HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência com fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*
rpm, rotações por minuto
RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
SFC, cromatografia com fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid chromatography*
SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*
SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*
ST, sólidos totais
TMA, íon tetrametilarsônio
TMAO, óxido de tetrametilarsônio
ton, toneladas
USN, nebulização ultrasônica, do inglês *ultrasonic nebulization*
UV-Vis, ultravioleta-visível

RESUMO

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método para a análise de especiação de As solúvel em subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, envolvendo a separação e determinação das espécies de As por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). A separação das espécies de As foi feita em uma coluna de troca aniônica.

A amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min para separação do material particulado. O sobrenadante foi filtrado a 0,45 μm e armazenado sob refrigeração a 4 °C até a análise. No momento da injeção no cromatógrafo, a amostra foi filtrada a 0,2 μm por um filtro acoplado na seringa. Foi verificado que a melhor condição de análise é quando a amostra é diluída 10 vezes (com a amostra concentrada foi verificado efeito de memória no sistema). Para a separação das espécies de As foi utilizada uma coluna de troca aniônica Dionex IonPac® AS14 (250 mm x 4 mm d.i., 9 μm de tamanho de partícula) e uma coluna-guarda Dionex IonPac® AG14 (50 mm x 4 mm d.i., 9 μm de tamanho de partícula). Para a separação adequada das espécies de arsênio foi utilizado carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$ como fase móvel, com o seguinte programa de eluição no modo isocrático: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; 10 min a 0,012 mol l⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Para a obtenção das curvas de calibração, foram empregadas soluções mistas contendo as espécies arsenobetaína (AsB), arsenito (As(III)), ácido dimetilarsônico (DMA), ácido *p*-arsanílico (*p*-ASA) e arsenato (As(V)), as quais são eluídas nesta ordem. Utilizando essas condições, foi possível separar 13 espécies de arsênio na amostra, porém, apenas 3 espécies (As(III), DMA e As(V)) foram quantificadas. A concentração de As(III), DMA e As(V) determinada em uma amostra do efluente investigado foi de 4,5; 6,9 e 808 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. Tendo-se em vista que não havia material de referência certificado (CRM) disponível, o método foi validado através da recuperação dos analitos adicionados na amostra, sendo que as recuperações ficaram entre 93 e 107%. A precisão do método também é boa, sendo o desvio padrão relativo (RSD) geralmente inferior a 6%. Os limites de detecção (LD) do método para AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V) foram de 5, 4, 19, 11 e 57 ng l⁻¹, respectivamente. Portanto, o método proposto é adequado para a análise de especiação de As, para as espécies investigadas, em subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, apresentando boa exatidão e robustez, apesar da complexidade da matriz da amostra.

ABSTRACT

The development of a method for As speciation in aqueous by-product of pyrolysis process of foliate bituminous is described in the present work. Arsenic species are separated by liquid chromatography (LC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). An anion exchange column was used to separated the As species.

The analyzed liquid samples were centrifuged at 10000 rpm for 10 min, the supernatant filtered through a 0.45 μm pore size filter and then kept at 4 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. Before being inject in the chromatograph, the supernatant was filtered once more through a 0.2 μm pore size filter coupled to the syringe. In order to avoid memory effects, the supernatant was ten-fold diluted before filtration in the syringe. The separation column was of anion exchange type Dionex IonPac[®] AS14 (250mm x 4mm i.d., 9 μm particle size). A Dionex IonPac[®] AG14 (50mm x 4mm i.d., 9 μm particle size) was used as guard column. Ammonium carbonate ((NH_4)₂CO₃) solution was used as mobile phase, according to the following program: 10 min, 0.0015 mol l⁻¹ (NH_4)₂CO₃; 10 min, 0.012 mol l⁻¹ (NH_4)₂CO₃ and 10 min, 0.02 mol l⁻¹ (NH_4)₂CO₃. Calibration curves of arsenobetaine (AsB), arsenite (As(III)), dimethylarsinic acid (DMA), *p*-arsanilic acid (*p*-ASA) and arsenate (As(V)) were obtained from serial dilution of standards and subsequent mixing. The retention time increased from AsB, As(III), DMA, *p*-ASA to As(V). Although 13 As species were separated and detected, quantification of only 3 species (As(III), DMA and As(V)) was possible. The concentrations found were 4.5, 6.9 and 808 $\mu\text{g l}^{-1}$ of As(III), DMA and As(V), respectively. The method was validated by recovery tests, being the recoveries within 93 and 107%. The limits of detection (LODs) of AsB, As(III), DMA, *p*-ASA and As(V) were, 5, 4, 19, 11, 57 ng l⁻¹, respectively, while the relative standard deviation (RSD) was typically bellow 6%.

1. INTRODUÇÃO

Até recentemente, a maioria das medidas analíticas estavam relacionadas com a determinação do conteúdo total de um elemento específico na amostra (tanto de elementos tóxicos como de elementos necessários ou essenciais aos organismos vivos). Contudo, foi constatado que esta informação não era suficiente, pois investigações bioquímicas e toxicológicas têm mostrado que, para organismos vivos, a forma química de um elemento específico, ou o estado de oxidação em que o elemento é introduzido no meio ambiente, é de suma importância.¹

Muitos compostos de arsênio estão presentes no ambiente e em sistemas biológicos. A toxicidade é dependente das espécies químicas,² sendo que o estado pentavalente (arsenato) é menos tóxico que o estado trivalente (arsenito). Além destes, outros estados de oxidação e diversos compostos organometálicos de As podem ser gerados por oxidação química e microbiológica, redução e reações de metilação.³ Entretanto, a toxicidade desses compostos é bem variável.

O arsênio está amplamente distribuído na crosta terrestre, solos, sedimentos, água, ar e organismos vivos, sendo que a concentração de arsênio em rochas ígneas e sedimentares, por exemplo, é de aproximadamente 2 mg kg^{-1} . O arsênio ocorre naturalmente em mais de 200 formas minerais diferentes, onde 60% são arsenatos, 20% são sulfatos e sulfosais e os 20% restantes incluem arsenitos, óxidos, silicatos e arsênio elementar, mas somente algumas dessas formas são encontradas em quantidades significantes.³ Outras fontes de ocorrência natural do arsênio são os combustíveis fósseis, tanto no petróleo, carvão e xisto. Os produtos gerados do processo de pirólise do folhelho betuminoso, como o óleo, bem como seus subprodutos, como a água sulfo-amoniaca, possuem traços de compostos orgânicos, metais e não-metais, que podem ser potencialmente tóxicos ao meio ambiente.

As técnicas utilizadas para a detecção das espécies de arsênio no ambiente e em amostras biológicas em geral, devem ser sensíveis e seletivas. A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem se tornado uma técnica de detecção favorável, por possuir uma alta sensibilidade, capacidade multi-elementar e pode ser combinada com as técnicas de separação comumente empregados para a análise de especiação.⁴

Outra técnica comumente empregada na especiação de arsênio é a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), que permite obter bons limites de detecção.⁴ Entretanto, nem todas as espécies de arsênio formam hidretos e técnicas de decomposição são usualmente requeridas, dificultando a análise.² Em resumo, para a análise de especiação, geralmente, é necessário o emprego de duas técnicas. Uma para a separação das espécies de interesse e outra para as suas medições. As técnicas de separação e detecção utilizadas na determinação de arsênio são dependentes do procedimento de preparo da amostra utilizada. A instabilidade das espécies durante a amostragem, armazenamento e pré-tratamento da amostra são importantes e devem ser consideradas.

Tendo-se em vista a crescente necessidade do conhecimento das diferentes espécies do elemento nos diferentes meios, neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método para a especiação de As em subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso. O método proposto envolve a separação e quantificação das espécies de As com um sistema de cromatografia a líquido (LC) acoplada à técnica de ICP-MS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ARSÊNIO

O arsênio (As) é um não-metal amplamente distribuído na crosta terrestre, e pode existir nas valências -3, 0, +3 e +5. Em ambientes fortemente redutores, arsênio elementar e arsina (AsH_3) podem ser encontrados. Em condições moderadamente redutoras, arsenito (AsO_2^-) possivelmente é a forma dominante, mas arsenato (AsO_4^{3-}) é geralmente o composto mais estável em ambientes oxidantes.⁵

Arsênio e seus compostos ocorrem na forma cristalina, vítrea ou amorfa. Geralmente, em quantidades de traço (na ordem de $\mu\text{g l}^{-1}$, $\mu\text{g g}^{-1}$, $\mu\text{g m}^{-3}$ ou inferior) em rochas, solos, água e ar. Porém, as concentrações podem ser mais altas em certas áreas como resultado de atividades antropogênicas, como queima de combustíveis fósseis, produção de fertilizantes e detergentes contendo fosfato, uso de pesticidas à base de As e emissões vulcânicas. Os sais de arsênio, por sua vez, exibem uma ampla faixa de solubilidade em água, dependendo do pH e do ambiente iônico.⁵

Sob condições oxidantes e aeradas, a forma de arsênio predominante na água e solo é o arsenato. Sob condições redutoras (< 200 mV), arsenito pode ser a forma de arsênio predominante. A taxa de conversão é dependente do potencial redox (Eh) e pH, bem como outros fatores físicos, químicos e biológicos.⁵

Em valores de Eh moderados ou elevados, arsênio pode ser estabilizado em uma série de oxianions pentavalentes, tais como o H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} e AsO_4^{3-} . Porém, sob condições muito redutoras (ácidas e levemente alcalinas) arsenito é a forma predominante.^{3,5}

A arsenopirita (FeAsS) e trissulfeto de arsênio (As_2S_3) são as formas mais

comuns de arsênio em minerais, podendo estar associado com diversos tipos de minerais, especialmente na forma de sulfetos.⁶ A habilidade do arsênio em ligar-se ao enxofre faz com que o arsênio esteja, em muitos casos, associado a minerais que contenham este elemento. Associado à ocorrência destes minerais, o teor de As em solos nestas regiões podem alcançar níveis elevados, da ordem de 100 mg kg^{-1} , ou superiores.⁵

Além dos compostos inorgânicos de As formados no meio ambiente, este elemento pode formar diversos compostos orgânicos, sendo os ácidos monometilarsênico (MMA) e dimetilarsônico (DMA) as formas mais comuns.⁵

A concentração natural de arsênio em águas de superfície e subterrâneas está na faixa de 1 a $10 \mu\text{g l}^{-1}$. Entretanto, em organismos marinhos acumulam-se (por mecanismos de bioacumulação) quantidades consideráveis de arsênio orgânico.⁵

O arsênio elementar (As^0) é comercialmente produzido pela redução do As_2O_3 (obtido como subproduto da fundição de alguns metais) com carvão e é ainda amplamente utilizado na fabricação de pesticidas, vidros, indústria química, indústria de semicondutores, catalisadores, preservantes de madeira e na medicina.^{5,6}

O arsênio está distribuído por toda crosta terrestre, nos solos, sedimentos, água, ar e organismos vivos.

SOLO: a presença de arsênio é dependente de fatores como clima e componentes orgânicos e inorgânicos presentes no solo, os quais podem influenciar no potencial redox. É encontrado principalmente na forma inorgânica, mas podem existir espécies na forma orgânica.³

ÁGUA: geralmente a concentração de arsênio em águas naturais é baixa e o limite aceitável é de no máximo $10 \mu\text{g l}^{-1}$.⁵ Na água do mar, a concentração pode variar entre 1 e $8 \mu\text{g l}^{-1}$, onde podem ser encontradas espécies como As(III), As(V), óxidos de tetrametilarsônio (TMAO), arsenocolina (AsC), arsenobetaina (AsB) e arsênio ligado a lipídios.⁶ Espécies como (As^0) e (AsH_3) são raras em ambientes aquáticos.

AR: o arsênio está predominantemente adsorvido no material particulado contido no ar, estando presente principalmente na forma de arsenito e arsenato.⁷

ORGANISMOS VIVOS: o As pode acumular nos tecidos de animais e vegetais, sendo a quantidade acumulada dependente da quantidade na qual o organismo é exposto, formas do elemento, tempo de exposição, entre outras.³

Os seres humanos podem estar expostos a uma série de diferentes formas de arsênio orgânico e inorgânico provenientes dos alimentos, água e meio ambiente em geral. Cada forma de arsênio tem diferentes propriedades físico-químicas e biodisponibilidade, o que dificulta o estudo da cinética e metabolismo dos compostos de arsênio em animais e humanos.³

O ser humano, quando exposto a compostos inorgânicos de arsênio (através da ingestão de água, por exemplo) por tempo prolongado, pode ter como resultado várias doenças como conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros.⁸ As rotas de entrada do arsênio no organismo podem ser através das vias respiratória (poeira e fumaça), oral (água e alimentos) e, ocasionalmente, dérmica. O acúmulo de arsênio pode ocorrer, principalmente, na pele, cabelo e unhas, e a forma de excreção se dá pela urina, fezes e, em menor quantidade, pelo suor.³

A toxicidade do arsênio depende, principalmente, da forma química e do estado de oxidação e, também, de outros fatores como estado físico (gás, dissolvido, tamanho de partículas de pó ao qual está adsorvido), taxa de absorção na célula, taxa de eliminação e natureza química dos substituintes no composto de As.³ A toxicidade dos principais compostos de arsênio decresce na ordem $\text{AsH}_3 > \text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{ácidos alquil-arsênio} > \text{compostos de arsênio} > \text{As}^0$.^{8,9} O arsenito é cerca de sessenta vezes mais tóxico que o arsenato, e os compostos inorgânicos são cem vezes mais tóxicos que as formas metiladas de As (MMA e DMA).¹⁰ Espécies como arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC) são relativamente pouco tóxicas.^{11,12} Na Fig. 1 está apresentado o ciclo biogeoquímico do arsênio.

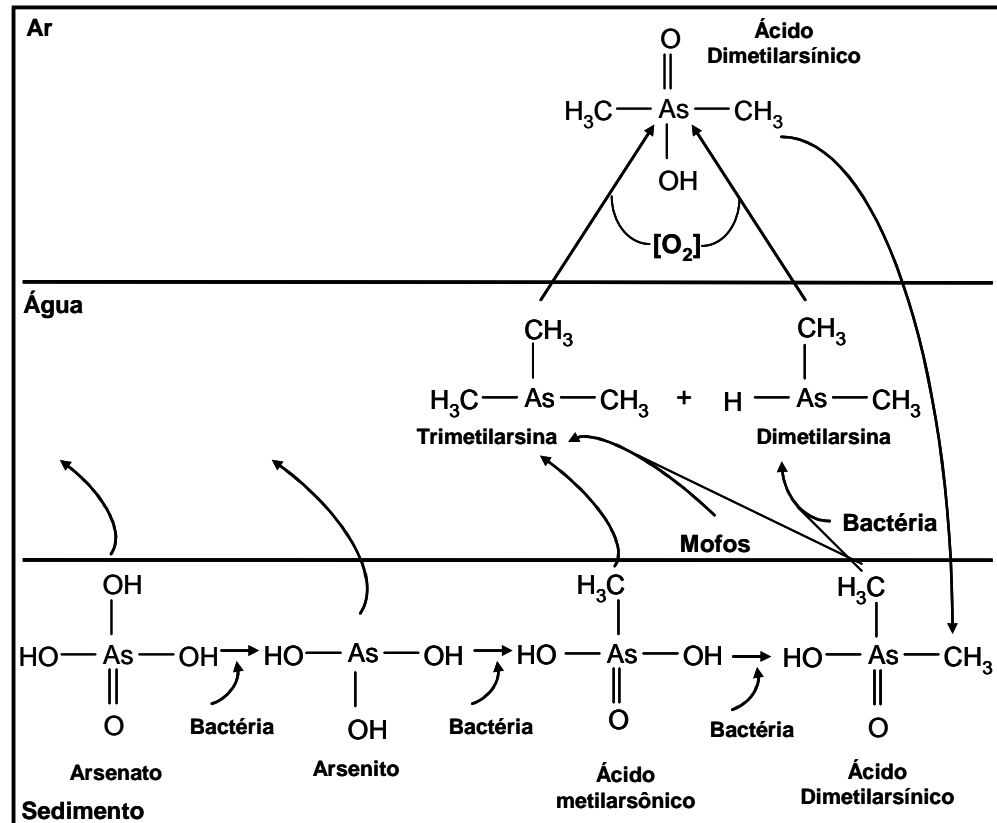


Figura 1. Ciclo biogeoquímico do arsênio (adaptado de Wood¹³).

Na Fig. 2 estão representadas as espécies de arsênio (orgânico e inorgânico) mais comumente encontradas no ambiente.

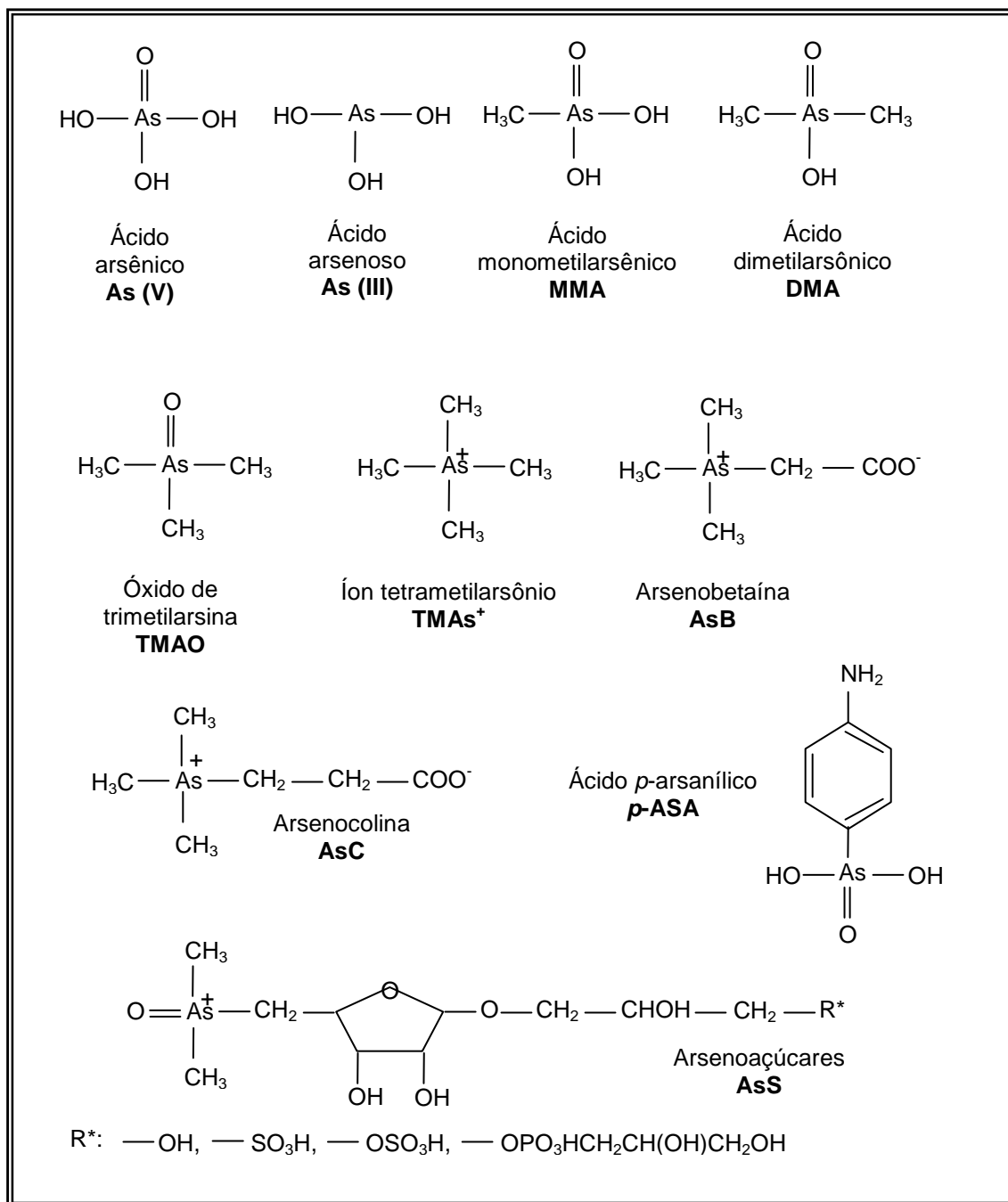


Figura 2. Estrutura química dos compostos de arsênio mais comuns no ambiente.^{6,14}

2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

Há alguns anos, a maioria das análises elementares estava relacionada à determinação da concentração total do elemento na amostra, ou seja, a grande maioria dos métodos analíticos permitia ao analista determinar somente a concentração total. Porém, com o decorrer do tempo se percebeu que esta

informação, em muitos casos, não era suficiente. Isto foi devido, principalmente, em função de investigações bioquímicas e toxicológicas, as quais mostraram que, além da concentração total de muitos elementos, a sua forma química e o seu estado de oxidação são de fundamental importância. Portanto, para obter informações sobre a atividade de um elemento específico, particularmente para espécies em contato com organismos vivos, é necessário que sejam determinadas, além da quantidade total do elemento, as formas químicas e físicas individualmente.¹⁵

De acordo com a definição dada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC),¹⁵ o termo “*espeiação*” é definido como sendo a distribuição de diferentes espécies químicas de um elemento em uma amostra, enquanto que o termo “*análise de espeiação*” é definido como um processo que conduz à identificação e determinação de diferentes formas químicas e físicas de um elemento existente em uma amostra.¹⁶

Desta forma, a análise de espeiação possui aplicações em diversas áreas, tais como:¹⁷

- estudos de ciclos biogeoquímicos de elementos químicos;
- avaliação da toxicidade e ecotoxicidade relativa de elementos específicos;
- controle de qualidade de produtos alimentícios;
- controle de medicamentos e produtos farmacêuticos;
- controle de processos tecnológicos;
- estudo de exposição ocupacional;
- análises clínicas.

2.2.1. Análise de espeiação de arsênio

O método adequado para a análise de espeiação é aquele em que a informação desejada é obtida sem alterar a espécie original do elemento contido na amostra. Por esta razão, estudos envolvendo a análise de espeiação de arsênio em amostras biológicas e ambientais vem despertando grande interesse em função da toxicidade e biodisponibilidade de algumas espécies. Devido às baixas concentrações de espécies de arsênio naturalmente encontradas, a análise de espeiação é mais problemática para este elemento. Entre elas pode-se citar a instabilidade das espécies durante a amostragem, o armazenamento e o tratamento

da amostra, a incompleta recuperação das espécies, as interferências de matriz na etapa da medição dos analitos, a falta de CRM apropriados e a falta de métodos apropriados para a extração dos analitos da amostra (para o caso de amostras sólidas).¹⁸ Como a toxicidade do As depende das espécies químicas, houve a necessidade de aperfeiçoar as técnicas analíticas convencionais para melhor compreensão da biogeoquímica, toxicidade e metabolismo do elemento. Essas técnicas devem fornecer informações com relação à exposição e ao ciclo natural do As no ambiente, bem como ajudar a avaliar o impacto ambiental e os riscos à saúde. Em parte, a sensibilidade da técnica de detecção é um fator muito importante.²

Na maioria dos casos, a análise de especiação de compostos de As tem sido feita com o uso de técnicas hífenadas, combinando uma técnica de separação das espécies com um método de detecção.¹⁹

Porém, há inúmeros fatores que podem afetar os resultados, e devem ser observados, durante a análise de especiação da maioria dos elementos. Um dos fatores mais importantes é a condição redox da amostra, que não somente determina o estado de oxidação de alguns elementos, mas também pode influenciar a biodisponibilidade e toxicidade do elemento. Por exemplo, Fe(II) e Mn(II) são solúveis em águas naturais com baixa concentração de oxigênio. Em outros casos, a foto-redução pode ser um fator importante, e mudanças no pH podem afetar o equilíbrio ácido-base e as condições redox.²⁰

Sendo assim, a análise de especiação envolve um complexo esquema, mas consiste, de uma maneira ou outra, em uma etapa de separação seguida da determinação do elemento nas diferentes frações.⁸

2.3. AMOSTRAGEM, PRESERVAÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS

Um requisito para obtenção de informações exatas das espécies de arsênio, está em manter a concentração e a forma química das espécies originais durante o preparo da amostra. Manter a forma química do elemento durante a amostragem e o preparo da amostra é, sem dúvida, um dos maiores desafios da análise de especiação. Contaminação, representatividade da amostra, possibilidade de precipitação dos analitos e o efeito de adsorção dos analitos na parede do recipiente que contém a amostra são, também, preocupações adicionais na análise de

especificação. Normalmente, métodos brandos de extração devem ser empregados para reduzir o risco de alterações das espécies. Por exemplo, na especificação de arsênio pode ocorrer facilmente a oxidação de algumas espécies durante o preparo da amostra.^{21,22} Alguns dos procedimentos propostos na literatura para o preparo de amostras para especificação de As serão enumerados a seguir.

2.3.1. Amostras sólidas

A extração de espécies de arsênio de materiais sólidos (sedimentos, solos, plantas ou tecidos biológicos) geralmente é uma das etapas mais críticas, uma vez que é nesta etapa que pode ocorrer a degradação ou a transformação das suas espécies.¹⁸ De maneira geral, o processo de preparo da amostra na análise de especificação de As em materiais sólidos inicia com a etapa de homogeneização. A extração dos analitos, que é normalmente considerada a etapa mais crítica, geralmente envolve o uso de uma grande variedade de solventes de alta pureza, que entre os mais comuns podem ser citados a água, metanol, misturas de água:metanol, água:metanol:clorofórmio, entre outros. Estes extratores não devem alterar as espécies de As presentes originalmente na amostra.²³

- *Solos e sedimentos*: a especificação de arsênio neste tipo de matriz é, frequentemente, fundamentada no uso de processos de lixiviação, e as espécies predominantes são As(III) e As(V).¹⁹ Para a extração das espécies de arsênio em solo ou sedimento tem sido propostos métodos de extração baseados no emprego de soluções de cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl),²⁴ Na₂CO₃ e NaHCO₃ em diferentes valores de pH,^{25,26} metanol²⁷ e ácido fosfórico diluído.²⁸⁻³⁰ Apesar da oxidação parcial do As(III), alguns autores utilizam o ácido fosfórico com aquecimento por radiação microondas a baixa potência.³¹⁻³³

- *Vegetais e alimentos*: alguns estudos foram feitos envolvendo a extração de arsênio inorgânico de cenoura utilizando extração acelerada com solvente (ASE)³⁴ e, também, radiação microondas,³⁵ sendo que a eficiência de extração para ambos os casos é entre 80 a 102%. Broeck *et al.*³⁶ estudaram a especificação de arsênio em feijão recém germinado em substrato contaminado com arsenito e arsenato. Os autores observaram que o arsênio acumulou-se nas raízes na forma de arsenito e nas folhas, em grande maioria, na forma de arsenato. B'Hymer e Caruso³⁷

propuseram a especiação de As(III), As(V) e DMA em maçã com o auxílio de sonicação, que além de promover a homogeneização da amostra, demonstrou ser um método rápido e fácil para a extração destes íons. P'Martinez *et al.*³⁸ fizeram extração enzimática de espécies de arsênio em comida para bebê, comprovando a eficiência do uso da tripsina. Entretanto, somente AsB foi detectada neste material. Pizarro *et al.*³⁹ avaliaram a eficiência de extração das espécies As(III), As(V), MMA, DMA, AsB e AsC em solo usando ácido fosfórico (H_3PO_4 1 mol l⁻¹ como extrator) e arroz, frango e peixe utilizando água ou mistura metanol:água como extrator. Neste trabalho, relataram que a mistura metanol:água (1:1) foi a mais eficiente na extração das espécies, após três extrações consecutivas. A recuperação foi em torno de 100%, exceto para as amostras de frango, onde a extração foi próxima de 75%. No solo, a recuperação das espécies de As ficou em torno de 82%, com apenas um ciclo de extração com H_3PO_4 1 mol l⁻¹. Observaram que as espécies As(III), As(V), MMA e DMA, após o processo de extração das amostras de arroz, permaneceram estáveis por até 3 meses. As espécies extraídas das amostras de tecido de frango, apresentaram estabilidade de 2 meses em qualquer mistura metanol:água. A AsB extraída das amostras de peixe foi mais estável quando foi utilizado um volume maior de metanol na mistura metanol:água. Nas amostras de solo, as espécies MMA e DMA permaneceram estáveis por até 3 meses, mas o As(III) foi gradualmente oxidado a As(V).

- *Materiais biológicos de origem marinha*: animais marinhos de quase todas as espécies contêm em seus órgãos, arsênio na forma de espécies organometálicas. A AsB é o composto majoritário em animais marinhos e arsenoaçúcares e arsenato são as espécies dominantes em algas marinhas. Para a extração de espécies inorgânicas ou polares é recomendado o emprego de água como extrator. Por outro lado, para a extração de espécies orgânicas ou menos polares, o recomendado é que se utilize metanol.²³

Um dos métodos de extração de espécies de arsênio empregado para algas marinhas é a ASE, a qual opera a temperatura e pressões elevadas e utiliza pequena quantidade de amostra.²³ Porém, foi observado que esta metodologia levou a baixas recuperações dos analitos. A quantificação e a confirmação estrutural das espécies de As foram feitas com o emprego da LC-ICP-MS e cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray (LC-ES-MS).⁴⁰ A composição do solvente e a massa de amostra utilizada são fatores significativos

no desempenho do método, bem como a temperatura e o tempo de extração podem exercer certa influência.¹⁹ Mistura metanol:água foi utilizada para extrair espécies de arsênio de frutos do mar com auxílio de sonicação.^{41,42} Procedimentos de “limpeza da amostra” (*clean up*) utilizando colunas (cartuchos) contendo sílica recoberta com grupos C_{18} ⁴³ e cartuchos contendo resina de troca catiônica Dowex^{®44} foram empregados para a remoção de lipídios e gorduras dos extratos das amostras. Procedimentos utilizando extração assistida por microondas,^{45,46} empregando uma mistura metanol:água tem mostrado ser um método simples e eficiente para extração de espécies de As de tecido de peixe⁴⁷ e outros tecidos animais.⁴⁵ Para a extração das espécies de As utilizaram uma baixa potência (50 a 75 W) da radiação microondas por um período de tempo entre 5 e 10 min. Desta forma, obtiveram recuperação de 85%. Procedimentos de extração com Soxhlet,^{48,49} também tem sido utilizados para extração de espécies de arsênio em frutos do mar. Este tipo de extração é muito utilizado para extração de espécies organometálicas, especialmente aquelas com alta volatilidade.²³

Métodos utilizando ácidos fortes vêm sendo utilizados desde 1970 para a extração de diversos elementos de amostras biológicas e ambientais. Normalmente, o ácido nítrico (HNO_3) concentrado é usado para a decomposição de amostras sólidas, mas às vezes, misturas de HNO_3 , ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido perclórico ($HClO_4$), entre outros, são empregados. Porém, na maioria das vezes, estes procedimentos não permitem que se obtenham informações das espécies presentes na amostra, uma vez que neste processo ocorre a degradação das espécies. Entretanto, ácidos diluídos podem ser usados como extratores de espécies químicas a partir de materiais biológicos empregando-se condições especiais, mas solventes como o tolueno, metanol e outros são, geralmente, mais adequados.²³

2.3.2. Amostras Líquidas

Geralmente, o primeiro passo na análise de especiação é a coleta da amostra, sendo que a preservação das espécies também deve ser considerada nesta etapa. Além disso, cuidados devem ser tomados no sentido de evitar perdas do analito devido à possibilidade de adsorção nas paredes dos frascos usados para

armazenagem da amostra ou devido a volatilização.²²

Para minimizar problemas relacionados com a contaminação da amostra, a descontaminação dos recipientes e outros materiais usados em seu manuseio é, frequentemente, feita com HNO₃. Entretanto, uma das principais desvantagens do uso deste procedimento é que qualquer resíduo de ácido pode causar a oxidação das espécies de arsênio presentes na amostra. Por essa razão, geralmente, ácidos não oxidantes devem ser empregados na descontaminação e preservação de amostras para análise de especiação.²²

Na escolha dos recipientes para armazenamento da amostra, os de polietileno ou politetrafluoretileno (PTFE ou Teflon[®]) são preferidos aos de vidro, pois há menor absorção de espécies inorgânicas e organometálicas.⁵⁰ Frascos de polipropileno^{51,52} e policarbonato⁵³ também podem ser utilizados.

A degradação de amostras por bactérias pode levar à conversão do arsênio inorgânico para formas metiladas. Para tal, o congelamento da amostra como forma de armazenamento, geralmente, minimiza qualquer tipo de degradação por bactérias ou enzimas, bem como possíveis perdas por volatilização.²²

A acidificação da água, ou outro tipo de amostra líquida, é uma prática comum para evitar processos de adsorção dos analitos. Porém, este procedimento não é recomendado para a preservação de amostras que contenham espécies organometálicas, pois elas podem ser degradadas nestas condições. Além disso, cuidados devem ser tomados quanto ao tipo de ácido para a preservação de amostras, em vista da possibilidade de interferências nas etapas subsequentes da análise. Por exemplo, se a medição de arsênio for feita por ICP-MS, o emprego de ácido clorídrico torna-se inadequado devido à interferência espectral causada por íons poliatômicos, tais como ArCl⁺.^{23,54}

Diversos métodos tem sido propostos para tentar preservar a distribuição das espécies de arsênio em amostras aquosas.² Neste sentido, Hall *et al.*⁵⁵ estudaram o comportamento das espécies As(III) e As(V) adicionadas em amostras de água deionizada e de água de rio. Neste trabalho foi observada a redução de As(V) para As(III) em poucos dias. Investigações feitas por Edwards *et al.*⁵⁶ utilizando ácido ascórbico e HCl como preservantes, em água de alta pureza, evidenciaram que ambos os ácidos mantiveram a concentração original de As(III) e As(V) por um período de até 28 dias.

Dificuldades podem surgir na preservação de espécies de As em águas ricas

em ferro. Em amostras de água potável ricas em Fe(III), espécies solúveis de arsênio podem formar precipitados insolúveis com ferro. A formação desses precipitados resulta na diminuição da concentração de arsênio na solução, afetando a exatidão da análise de especiação.²

Na tentativa de contornar esse problema, Gallagher *et al.*⁵⁷ adicionaram ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em amostras de água para diminuir a formação de precipitados com ferro. O EDTA complexa o Fe e inibe a precipitação, conseqüentemente, mantendo a concentração das espécies de As(III) e As(V) por um período de até 10 dias.

Amostras com concentração de As(III) e As(V) entre 0,5 e 1 mg l⁻¹, e armazenadas sob refrigeração (4 °C), apresentaram estabilidade por 21 dias. Após 29 dias as espécies de As já sofreram uma pequena transformação (oxidação do As(III) e redução do As(V)). Por outro lado, amostras com altas concentrações de arsênio (20 mg l⁻¹ ou mais) podem ser armazenadas a temperatura de 25 °C sem perda significativa das espécies. Porém, em soluções com baixas concentrações de As, foram observadas transformações (oxidação do As(III) e redução do As(V)) após uma semana.⁵⁸

Alguns autores recomendam o congelamento de amostras aquosas a temperaturas na ordem de -20 °C, afirmando ser a melhor maneira de preservação das espécies de As.⁵⁰ Estudos com diferentes temperaturas de armazenamento foram feitos por Lindemann *et al.*⁵⁹ Foram avaliadas temperaturas de -20, 3 e 20 °C para a preservação de espécies de arsênio (As(III), As(V), MMA, DMA, ácido fenilarsônico (PAA) e AsB) em solução. Os melhores resultados obtidos foram para temperaturas de cerca de 3 °C, e os piores resultados para temperaturas de -20 °C. Ou seja, parece que não há um consenso quanto ao uso deste procedimento de preservação de espécies em meio aquoso.

Métodos para separação das espécies inorgânicas *in situ* imediatamente após a amostragem têm sido utilizados e recomendados por muitos autores. Neste sentido, Le *et al.*⁶⁰ utilizaram cartuchos de fase-sólida (com trocador catiônico forte e trocador aniônico forte) para especiação de arsênio em material particulado e arsênio solúvel. Os autores filtraram (em filtro com diâmetro de poro de 0,45 µm) a amostra e um volume conhecido da mesma foi passado por uma coluna contendo resina de troca aniônica forte. O arsênio particulado é retido pelo filtro, e o cartucho com resina de troca aniônica retém o As(V). As espécies de As(III) não são retidas e

determinadas no efluente. O As(V) retido no cartucho de troca aniônica é, subsequentemente, eluído com HCl 1 mol l⁻¹ e quantificado.

Geralmente, os compostos metilados de arsênio são mais estáveis que compostos inorgânicos, tanto em amostras de água quanto em amostras de urina.^{59,61} Neste sentido, Palacios *et al.*⁵⁰ estudaram a estabilidade das espécies As(V), MMA, DMA, AsB e AsC armazenadas a -20 °C. Essas espécies, adicionadas em água deionizada, permaneceram estáveis por um período de até 67 dias. O mesmo comportamento foi observado para MMA, DMA e AsB, em urina.

Huang e Ilgen⁶² estudaram o efeito da adição de EDTA em amostras de água de chuva. As espécies de arsênio (As(III), As(V), MMA, DMA, AsC e AsB) permaneceram estáveis durante uma semana quando armazenadas ao abrigo da luz.

Sánchez-Rodas *et al.*⁶³ utilizaram três procedimentos de preservação de amostras líquidas a partir da adição de EDTA 0,25 mol l⁻¹ e *clean-up in situ* com uma resina de troca catiônica para reduzir a concentração de metais e evitar a co-adsorção do As com precipitados de Fe. O método proposto baseia-se na acidificação da amostra com HCl 6 mol l⁻¹ seguido de *clean-up in situ* com resina de troca catiônica, para a preservação das espécies As(III), As(V) e DMA em amostras de efluente ácido de mineração. As amostras foram armazenadas a temperaturas de -18, 4 e 20 °C. O método baseado na acidificação da amostra com HCl, armazenamento a -18 °C e *clean-up in situ* com resina de troca catiônica minimizou os problemas de interferência causadas por cátions metálicos (como o Fe) e permite preservar a amostra por até 48 horas.

Daus *et al.*⁶⁴ investigaram a estabilidade das espécies As(III) e As(V) em amostras líquidas contendo alta concentração de Fe (acima de 15 mg l⁻¹) e concentração total de arsênio acima de 2 mg l⁻¹. Os autores utilizaram cinco formas de tratamento das amostras. Um tratamento consistiu da filtração da amostra com membrana de acetato de celulose (0,45 µm). As quatro amostras restantes não foram filtradas, sendo adicionados, separadamente, 10 mg l⁻¹ de nitrilotriacetato (NTA), 0,01 mol l⁻¹ de ácido acético (HAc), 0,01 mol l⁻¹ de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 0,01 mol l⁻¹ de HCl. Em todos os estabilizantes foi borbulhado hélio para eliminação do oxigênio, com o objetivo de minimizar os efeitos de oxidação. A melhor estabilização para As(III) (recuperação em torno de 96%) foram observados com o uso de H₃PO₄ e refrigeração, onde foi observada que não há alteração do As(III)

num período de uma semana, tanto para altas como para baixas concentrações do elemento.

Hall *et al.*⁵⁵ também avaliaram a estabilidade das espécies inorgânicas de arsênio em água deionizada (adicionada dos analitos) e água de rio. Avaliaram, como preservantes, soluções a 0,1% (v/v) de HNO₃ ou HCl. Para as amostras armazenadas a temperatura ambiente (22 °C), a estabilidade foi de no máximo 2 dias, havendo a redução de, praticamente, 100% do As(V). Foi verificado que a redução da concentração de As não é devido à precipitação ou adsorção no frasco, e sim pela conversão para o estado de valência (III). As soluções estocadas sob refrigeração não apresentaram variação na concentração durante um período de até 11 dias. Observaram que uma transformação quantitativa do As(V) para As(III) ocorre entre 48 e 72 horas para amostras contendo 1 µg l⁻¹. Entretanto, em soluções com 20 µg l⁻¹ há conversão de somente 50% do As(V) neste mesmo período.

Jókai *et al.*⁵⁸ observaram que MMA e DMA, em concentrações entre 0,01 e 10 µg l⁻¹, permaneciam estáveis durante 5 a 6 meses em água à temperatura ambiente. Já as espécies As(III) e As(V) em concentrações de 0,5 a 20 mg l⁻¹ (em água) permaneciam estáveis por até 4 semanas, se armazenadas a temperatura de 4 °C e em recipientes de vidro.

Em outro estudo sistemático, Feldmann *et al.*⁵⁴ avaliaram os efeitos de diferentes temperaturas de armazenamento e o uso de aditivos na estabilidade das espécies As(III), As(V), MMA, DMA e AsB em urina *in natura* e, também, em amostras que sofreram adição das espécies de As. As amostras de urina puderam ser estocadas a baixas temperaturas (4 e -20 °C) por 2 meses, sem mudança substancial na concentração das espécies. Para longos períodos de armazenamento, a estabilidade das espécies de arsênio varia de acordo com a matriz da amostra. Segundo os autores, o uso de aditivos como, HCl, azida de sódio (NaN₃), cloreto de benziltrimetilamônio (C₁₀H₁₆NCl.H₂O), ácido benzóico (C₇H₆O₂), cloreto de cetilpiridina (C₂₁H₃₈NCl.H₂O) e metanol, não influenciou na estabilidade das espécies na urina. A adição de HCl 0,1 mol l⁻¹ às amostras, causou algumas mudanças na concentração das espécies inorgânicas de arsênio.

2.4. TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E DETECÇÃO

Muitos dos métodos de especiação baseiam-se em uma etapa de separação combinada com uma etapa de detecção. A escolha do método de separação adequado depende, principalmente, de propriedades físico-químicas, como volatilidade, carga e polaridade das diferentes espécies, sendo que às vezes faz-se necessária a utilização de dois ou mais métodos de separação. A escolha de uma técnica adequada de detecção dependerá, principalmente, da concentração das espécies presentes na amostra.⁶⁵ Desta forma, a seguir serão citadas algumas das técnicas de separação e detecção comumente empregadas, dando-se ênfase àquelas empregadas para a especiação de As.

2.4.1. Técnicas de separação

Técnicas cromatográficas, tais como cromatografia a gás (GC), cromatografia a líquido de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC), cromatografia com fluido supercrítico (SFC) e cromatografia íons (IC), atualmente estão sendo amplamente utilizadas na análise de especiação de arsênio. Entre as várias versões de eletroforese capilar (CE), e a eletroforese capilar de zona (CZE) também tem sido comumente utilizadas para especiação de arsênio.^{2,23}

2.4.1.1. Cromatografia a gás

Cromatografia a gás é utilizada para especiação de compostos organometálicos que são voláteis na temperatura de trabalho da técnica e, assim, aplicada para a especiação de compostos orgânicos de arsênio. Espécies não voláteis de arsênio devem ser convertidas em espécies voláteis por processos de derivatização. A GC é amplamente empregada na análise de especiação de arsênio devido a seu desenvolvimento e o uso de colunas com um alto poder de separação. O acoplamento da GC a detectores com ionização em chama (FID), captura de elétrons (ECD), fotometria de chama (FPD), espectrômetros de massa com plasma indutivamente acoplado, espectrômetros de absorção atômica, espectrômetros de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado etc., tornam esta técnica uma ferramenta muito utilizada na análise de especiação. A separação de arsênio por GC

é controlada por uma série de parâmetros, destacando-se entre os mais importantes, a natureza da fase estacionária (coluna), temperatura da coluna, injetor e detector, derivatização, volume de injeção e sensibilidade do detector.²³

Schoene *et al.*⁶⁶ converteram vários halogênios, óxidos e hidróxidos de compostos orgânicos de arsênio em seus tioarsenitos correspondentes por reação com ácido éster metil tioglicólico (TGM). Os rendimentos e as estruturas químicas dos derivados do TGM foram avaliados pelo acoplamento do cromatógrafo a gás com um espectrômetro de massa ou um espectrômetro de emissão atômica.

Mester e Pawliszyn⁶⁷ determinaram as espécies MMA e DMA em urina humana com auxílio da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e detecção por espectrometria de massa acoplada à cromatografia a gás (GC-MS). Os limites de detecção para MMA e DMA, foram de 0,29 e 0,12 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente, e a faixa linear foi de 1 a 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Os autores relataram, também, a possibilidade de fazer a extração *in situ*, pois não observaram mudança na concentração das espécies em um período de 2 horas. O tempo necessário para a separação foi inferior a 12 min.

Grüter *et al.*⁶⁸ desenvolveram uma técnica para especiação de compostos de arsênio (AsH_3 , MMA, DMA, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ e $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{AsH}_2$), entre outras espécies de alguns elementos (Bi, Ge, Hg, I, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Te e W) em solo proveniente de depósitos de lixo doméstico. Para as determinações, os autores fizeram o acoplamento entre as técnicas de geração de hidretos (HG), GC a baixa temperatura (LT-GC) e ICP-MS. O limite de detecção (LD) absoluto foi inferior a 0,7 pg para todos os elementos. O mesmo grupo de pesquisadores⁶⁹ utilizou o acoplamento (HG-LT-GC-ICP-MS) para a determinação de algumas espécies de arsênio (AsH_3 , MMA, DMA e $(\text{CH}_3)_3\text{As}$) e de espécies de Ge, Hg, Sb, Se e Sn em urina humana após o consumo de peixe. Os limites de detecção obtidos foram na faixa de 2 a 12 pg l^{-1} .

Um método para especiação de arsênio utilizando SPME para derivatização e cromatografia a gás com detecção simultânea por espectrometria de massa e fotometria de chama pulsada (PFPD) foi desenvolvido por Killelea e Aldstadt.⁷⁰ Os pesquisadores, além de tentar desenvolver um método o mais exato possível, investigaram a estrutura dos produtos da reação dos derivados de tiol com DMA através do espectro de massa. Pelo fato de PFPD possuir um grande número de variáveis que influenciam na medição, os autores necessitaram fazer otimização do método de forma multivariada.

Mothes e Wennrich⁷¹ determinaram espécies organometálicas de As, Hg e Pb em urina utilizando a técnica de SPME acoplada a GC e detecção por emissão atômica. A extração dos diferentes compostos organometálicos de cada elemento foi otimizada variando o tipo de fibra, o tempo de exposição, taxa de agitação, pH e tempo de dessorção. Os limites de detecção obtidos foram na faixa de pg l^{-1} a ng l^{-1} .

Apesar de possuir muitas vantagens, a GC apresenta certas desvantagens com relação ao procedimento de derivatização dos íons metálicos de arsênio, particularmente em amostras ambientais. Além disso, a derivatização é um processo trabalhoso, além de consumir uma quantidade de reagentes relativamente elevada. Além disso, a extração das amostras requer atenção especial, caso contrário, problemas podem ocorrer no procedimento de derivatização.²³

2.4.1.2. Cromatografia a líquido de alta eficiência com fase reversa

A cromatografia a líquido de alta eficiência com fase reversa vem sendo amplamente utilizada para a separação de um grande número de elementos/espécies utilizando uma variedade de tipos de colunas e fases móveis. Essa técnica tem a vantagem de permitir executar separações de espécies não voláteis de arsênio, tendo assim, maior versatilidade quando comparada com a GC.²³

A RP-HPLC utiliza sólidos não polares com grande área superficial como fase estacionária e soluções mais polares, em relação à fase estacionária, como fase móvel. As colunas mais utilizadas são de sílica recoberta com grupos C_2 , C_8 ou C_{18} , enquanto as fases móveis são soluções como, por exemplo, ácido fosfórico, fosfato de tetrabutylamônio, ácido malônico, ou misturas como metanol:água, acetonitrila:água, entre outras.²³

Um estudo detalhado da especiação de arsenobetaina, arsenocolina e o íon tetrametilarsênio (TMA) foi feito por Balis *et al.*⁷² Em uma interface de quartzo, o eluente (metanol) foi nebulizado e pirolizado em uma chama metanol/oxigênio, e os analitos termodinamicamente derivatizados a hidretos na presença de excesso de hidrogênio. Os hidretos voláteis foram transportados e atomizados em uma chama H_2/O_2 . Para a detecção das espécies de As, foi utilizado um instrumento de HG AAS.

Do *et al.*⁷³ utilizaram uma coluna C_{18} para a separação das espécies, e após

foram gerados os hidretos correspondentes a cada espécie, e a detecção feita por ICP OES. Foram analisadas amostras de urina de pacientes tratados com As_2O_3 , e determinadas as espécies As(III), As(V), MMA e DMA em concentrações na faixa de $\mu\text{g l}^{-1}$. O tratamento das amostras foi feito por centrifugação seguida de uma etapa de filtração. As amostras tratadas foram armazenadas em frascos de polipropileno a uma temperatura de 4 °C.

Van Elteren *et al.*⁷⁴ determinaram as espécies As(III) e As(V) em água mineral. Utilizaram a técnica de HPLC-HG AFS para as determinações. Também utilizaram uma técnica convencional baseada na co-precipitação do As(III) com dibenzilditiocarbamato antes da determinação de arsênio por FI-HG AFS. As duas técnicas apresentaram resultados semelhantes (diferença em torno de 5%), porém, a HPLC-HG AFS leva a limites de detecção superiores ($1 \mu\text{g l}^{-1}$) em relação à técnica de co-precipitação ($0,05 \mu\text{g l}^{-1}$). Para a separação das espécies de As foi utilizada uma coluna de troca aniônica Hamilton PRP-X100 (250 x 4,1 mm) e KH_2PO_4 como fase móvel a pH 6,1. Para a identificação dessas mesmas espécies, Ali e Aboul-Enein⁷⁵ utilizaram uma coluna Encosil C_{18} (250 x 4,6 mm) e uma mistura acetonitrila:água (20:80, v/v) como fase móvel. A detecção foi feita por UV-Vis (410 nm) e HG AAS, respectivamente e sucessivamente. Os limites de detecção foram de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ para As(III) e de $20 \mu\text{g l}^{-1}$ para As(V).

Rattanachongkiat *et al.*⁷⁶ descreveram métodos para especiação de arsênio utilizando HPLC-ICP-MS. Foram determinados As(III), As(V), MMA, DMA e AsB em amostras biológicas (peixes e crustáceos) e ambientais (sedimento). Para as amostras biológicas a extração das espécies de As foi auxiliada com enzimas, onde observaram recuperações entre 82 e 102%. Para as amostras ambientais, foi feita a extração utilizando H_3PO_4 em sistema aberto, auxiliado com radiação microondas. Para a separação das espécies de As em ambos os extratos, foi empregada uma coluna Hamilton PRP-X100.

A otimização experimental das condições para especiação de arsênio por RP-HPLC é muito importante, e começa na escolha adequada da coluna de fase reversa e da fase móvel, bem como, o controle de fatores como pH e concentração da fase móvel.²³

2.4.1.3. Cromatografia por par iônico

A cromatografia por par iônico tem sido utilizada na determinação de espécies neutras e carregadas de As. A técnica baseia-se na adição de um contra íon na fase móvel, tipicamente referido como reagente par iônico, consistindo em uma molécula com uma extremidade polar (denominada de cabeça) e outra não polar (denominada de cauda). Ambas as técnicas de cromatografia por par aniônico e par catiônico tem sido utilizadas para a separação de espécies de arsênio.^{2,23} Tetrabutylamônio (TBA), na forma de hidróxido ou fosfato, é comumente utilizado como reagente par iônico (catiônico) para a separação de As(III), As(V), MMA e DMA.² A separação dessas espécies de arsênio é dependente da concentração do reagente par iônico, da vazão, da força iônica e do pH da fase móvel.^{77,78} A faixa ótima de pH para a separação das quatro espécies citadas anteriormente é entre 5 e 7. Nessa faixa de pH, As(III) (com pK_a de 9,2) é uma espécie neutra, que é eluída sem interação com a fase estacionária. Quando se utiliza uma coluna com resina como suporte e fase móvel com pH em torno de 9, o As(III) é fracamente retido e pode ser separado da AsB. A AsB, um *zwitterion*, não é retida sob condições de cromatografia por par aniônico.²

Em estudos feitos por Le e Ma,⁴² foram determinadas as espécies As(III), As(V), MMA e DMA em apenas 3 min utilizando uma coluna guarda e detecção por AFS. Foi utilizada uma coluna guarda de fase reversa C_{18} (30 x 4,6 mm), sendo obtidos limites de detecção na faixa de 0,4 a 0,8 $\mu\text{g l}^{-1}$ em urina. Foi utilizada, também, uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm) para comparação. A fase móvel para ambas as colunas, porém em concentrações diferentes, foi composta de hidróxido de tetrabutylamônio, ácido malônico e metanol.

Gong *et al.*⁶¹ utilizaram uma coluna de fase reversa C_{18} (ODS-3; 150 x 4,6 mm) para identificar metabólitos de As (MMA e DMA) em urina humana e, também, avaliaram a estabilidade destas espécies sob diferentes condições de armazenamento. Para a separação e detecção das espécies utilizaram um sistema HPLC-HG AFS, com a fase móvel constituída de uma mistura de hidróxido de tetrabutylamônio (0,0047 mol l^{-1}), ácido malônico (0,002 mol l^{-1}) e metanol (4%), todos a pH 5,85.

Outros sistemas cromatográficos com par iônico utilizando hidróxido de tetraetilamônio (TEAH) como reagente par iônico foram desenvolvidos para a determinação de AsB e arsenoaçúcares em organismos marinhos.⁷⁹ Foram,

também, desenvolvidas metodologias para análise de especiação de arsênio em metabólitos excretados via urina humana após ingestão de frutos do mar,⁸⁰ e feitos muitos estudos para especiação em amostras ambientais.⁸¹

Na separação de espécies catiônicas de arsênio também podem ser utilizados como reagentes par iônico, o pentanosulfonato,^{82,83} hexanosulfonato,^{12,84} heptanosulfonato^{79,85} e dodecilsulfonato.⁸⁶ Fase móvel mista contendo dois reagentes par iônico, hexanosulfonato 0,01 mol l⁻¹ e TEAH 0,001 mol l⁻¹, foi utilizada para separar As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC e TMA em coluna de fase reversa C₁₈.^{12,87} As espécies foram detectadas, após tratamento do eluato contendo as espécies de As em um sistema constituído de uma etapa de digestão *on line* em forno de microondas, por HG AFS.

2.4.1.4. Cromatografia por exclusão

A cromatografia por exclusão apresenta algumas vantagens quando comparada a outros métodos que empregam LC, como a possibilidade de caracterizar compostos com massa molecular desconhecida.⁸⁸ Porém, a técnica apresenta algumas desvantagens, como a dependência do tamanho molecular na separação e a capacidade limitada da coluna.⁸⁹

Uma excelente separação entre As(III), As(V), MMA, DMA e AsB foi obtida em uma resina metacrilato carboxilada, em um tempo de até 13 min. O método possibilita a separação de até oito espécies de As, porém é necessário 1 hora para que todas as espécies sejam eluídas.⁹⁰

Técnicas de cromatografia por exclusão a baixa ou alta pressão têm sido utilizadas para especiação de arsênio. A exclusão a baixa pressão é, normalmente, utilizada para remoção de moléculas grandes da matriz, como proteínas do soro sanguíneo⁹¹ e extratos biológicos.⁹² HPLC por exclusão é tipicamente utilizada em conjunto com outras técnicas de separação para identificar espécies orgânicas de arsênio em animais.^{93,94}

2.4.1.5. Eletroforese capilar

Vários métodos têm sido usados para a análise de especiação de arsênio, mas ainda há necessidade de métodos rápidos, sensíveis e de baixo custo para a especiação de elementos em nível de traço. A CE tem sido acoplada a detectores específicos como instrumentos que utilizam radiação ultravioleta (UV), AAS, AFS, ES-MS, ICP OES, ICP-MS, etc.^{23,95} Mais recentemente, vem aumentando o número de publicações referentes à seletividade, sensibilidade e aplicações para a especiação de íons metálicos.⁹⁵⁻⁹⁷ A CE possui certas vantagens em relação às técnicas cromatográficas, incluindo simplicidade, custo relativamente baixo, alta velocidade de processamento da amostra e pouca dependência do tipo de matriz.²³

Devido a grande necessidade de determinação de espécies de arsênio, muitos estudos têm sido feitos com esta finalidade por CE. Lin *et al.*⁹⁸ determinaram quatro espécies de arsênio em cinza leve de carvão utilizando CZE com detecção indireta por absorção na região do UV. Foi utilizado cromato de sódio como eletrólito e, também, foi feito um estudo do pH da solução na separação das espécies. Os limites de detecção absoluto para As(III), As(V), MMA e DMA foram de 3,5; 5,2; 15,6 e 15,6 pg, respectivamente.

Olesik *et al.*⁹⁹ acoplaram a CE a instrumentos de ICP OES e ICP-MS para análise de especiação de compostos inorgânicos de arsênio. Para a etapa de separação foi utilizado um potencial de 10 kV, uma corrente de 5 a 10 μA e eletrólito composto de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,06 mol l^{-1} . O volume de amostra injetado foi de 0,08 a 0,14 μl , e os limites de detecção entre 0,06 e 2 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Michalke e Schramel¹⁰⁰ determinaram MMA e DMA por CZE acoplada a um instrumento de ICP-MS, utilizando tampão fosfato como eletrólito. Posteriormente, Michalke e Schramel¹⁰¹ desenvolveram uma metodologia baseada na separação de seis espécies de arsênio utilizando o sistema CE-ICP-MS. Foram analisadas amostras ambientais e de urina, e utilizado o tampão fosfato como eletrólito. Os limites de detecção foram de 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ para As(III), As(V), MMA e DMA, e 65 $\mu\text{g l}^{-1}$ para AsB e AsC.

A otimização das condições para CE envolve uma série de parâmetros que devem ser levados em consideração na análise de especiação. Estes podem ser divididos em duas classes, isto é, os parâmetros independentes que estão sob controle direto do operador (escolha do tampão, pH do tampão, força iônica do tampão, voltagem aplicada, temperatura do capilar, dimensão do capilar e o tipo de eletrólito) e os parâmetros dependentes, que são diretamente afetados pelos

parâmetros independentes e não estão sob controle direto do operador. Esses parâmetros são o fluxo eletrosmótico (EOF), aquecimento Joule, viscosidade do eletrólito, difusão da amostra, mobilidade da amostra, carga da amostra, interação da amostra com o capilar e eletrólito, absorvidade molar e etc.²³

Muitos dos métodos de CE para especiação de arsênio foram aplicados somente para a separação das espécies de As em soluções de referência. Porém, quando são analisadas amostras reais, uma mudança nos tempos de migração é observada, dificultando sua aplicabilidade.¹⁰² Embora a técnica tenha sido aprimorada muito na questão da minimização das interferências da matriz, os métodos de separação por CE para especiação de arsênio mostram-se limitados à análise de soluções de referência puras e sistemas com matrizes simples. No entanto, os limites de detecção para separações por CE, geralmente, são inferiores aos que utilizam HPLC quando o mesmo sistema de detecção é empregado.²

2.4.2. Técnicas de detecção

A análise de especiação de As em nível de traço requer uma técnica de detecção com alta sensibilidade. As técnicas de espectrometria atômica oferecem uma boa sensibilidade para detecção deste elemento, possibilitando o acoplamento a técnicas de separação, principalmente as cromatográficas.² Entre as técnicas mais utilizadas para a detecção de arsênio podem ser citadas a espectrometria de absorção e emissão atômica e a espectrometria de massa.¹⁰³ Algumas aplicações destas técnicas serão discutidas a seguir.

2.4.2.1. Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) é utilizada como detector em HPLC para especiação de arsênio desde a década de 1980, mas seu uso vem diminuindo.² Em razão da técnica de F AAS ser pouco sensível e apresentar um sinal de fundo relativamente elevado na determinação de As, muitas aplicações recentes da AAS são combinadas com a HG.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Algumas pesquisas foram feitas para o uso da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

(GF AAS) para detecção. Contudo, o acoplamento direto da técnica de HPLC à GF AAS torna-se difícil principalmente devido a sua característica descontínua de operação.² Assim, o procedimento envolve a coleta de frações das soluções que saem da coluna cromatográfica seguida da análise. Este procedimento é feito em batelada, para posterior análise de cada fração por GF AAS.⁷⁸

Krivan e Arpadjan¹⁰⁶ estudaram a influência de diferentes matrizes (HCl, NaCl, HNO₃ e urina) e vários modificadores químicos (W, Pd e uma mistura W + Pd + ácido cítrico) no comportamento de As(III) e As(V) no tubo de grafite. Na determinação de espécies de As por GF AAS, a maioria dos procedimentos envolvendo processos de extração são aplicados para a especiação de As(III) e As(V).¹⁰⁷ No entanto, em um trabalho feito por Bavazanno *et al.*¹⁰⁸ foi avaliada a aplicação de um procedimento de extração para compostos orgânicos de arsênio. Somente as espécies As(III), As(V), MMA e DMA foram totalmente extraídas em tolueno de amostras acidificadas de urina. O procedimento apresentou boa concordância quando comparado com os resultados obtidos por HPLC-ICP-MS, e o método foi recomendado para avaliação do nível de exposição ocupacional a arsênio inorgânico.

Pacey e Ford¹⁰⁹ e Grabinski¹¹⁰ se valeram da forte afinidade de espécies de arsênio com uma resina de troca iônica para separar completamente quatro espécies de arsênio e determinar o analito contido em cada fração por GF AAS.

2.4.2.2. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado tem sido muito utilizada no acoplamento com a técnica de HPLC para especiação de arsênio.^{111,112} O acoplamento é feito diretamente ao nebulizador pneumático do instrumento em função da vazão normalmente empregada em HPLC (em torno de 1,0 ml min⁻¹) ser compatível com a utilizada em instrumentos de ICP OES.² No início de sua utilização, algumas aplicações foram demonstradas, primeiramente para amostras com altas concentrações de arsênio. O sistema HPLC-ICP OES possui baixa sensibilidade, mas muitos estudos demonstram que introduzindo um sistema de geração de hidretos entre o cromatógrafo e o instrumento de ICP OES há uma considerável melhoria na sensibilidade.^{113,114}

Alguns pesquisadores sugerem que um aumento na sensibilidade pode ser obtido através de uma separação inicial do analito da matriz (extração com solvente), seguida da geração do hidreto diretamente do meio não aquoso e detecção do analito por ICP OES.¹¹⁵

2.4.2.3. Espectrometria com geração de hidretos

A geração de hidretos é um processo de derivatização química que produz hidretos voláteis pelo tratamento da amostra com um agente redutor, geralmente tetraidroborato de sódio (NaBH_4), em meio ácido. Técnicas que empregam a geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica, emissão atômica, fluorescência atômica e espectrometria de massa possuem muitas aplicações na determinação de arsênio em nível de traços. Por ser um método eficiente de introdução de amostras, a técnica de HG promove um aumento de sensibilidade na ordem de 10 a 100 vezes quando comparado a sistemas que empregam nebulizadores pneumáticos. A técnica de HG possibilita a separação das espécies de arsênio da maioria de outros componentes da amostra, por que apenas os hidretos gasosos chegam até o espectrômetro, de maneira que o restante da matriz da amostra fique na fração líquida. Interferências espectrais e químicas são, praticamente, eliminadas.²

Muitos compostos orgânicos de arsênio não formam hidretos voláteis pela simples ação do NaBH_4 , havendo a necessidade do desenvolvimento de métodos que possibilitem a conversão destes compostos a espécies formadoras de hidretos.² Alguns compostos, além do NaBH_4 , podem ser utilizados na geração de vapor, dentre eles destacam-se o SnCl_2 em HCl concentrado¹¹⁶ e alumínio em meio básico.^{9,117}

Devido aos altos fatores de diluição associados às separações cromatográficas convencionais, as mais sensíveis e específicas técnicas de detecção são necessárias para compensar estes efeitos. Técnicas de geração de hidretos após procedimentos de separação por HPLC eliminam problemas como alta concentração salina dos eluentes, em função da conversão do analito a hidretos gasosos e subsequente separação do restante da matriz da amostra.¹¹⁸

Muitos sistemas têm sido desenvolvidos baseados na geração de hidretos

após a coluna cromatográfica para a subsequente determinação de espécies de arsênio em água natural,¹¹⁹ alga marrom,¹²⁰ urina,¹²¹ entre outros.

Oxidação assistida por microondas^{122,123} e foto oxidação *on line* por radiação UV^{103,124-126} com K₂S₂O₈ e NaOH são muito eficientes na conversão de AsB, AsC, TMA, arsenoaçúcares e compostos metilados de arsênio em espécies formadoras de hidretos.

Empregando a espectrometria de fluorescência atômica como detector, os limites de detecção foram melhorados (que eram na faixa de $\mu\text{g l}^{-1}$ para detecção por AAS), tornando a técnica muito atrativa em razão de sua alta sensibilidade. O acoplamento do HPLC com HG AFS possui a vantagem do bom poder de separação da HPLC e da boa seletividade e sensibilidade obtida utilizando HG AFS.²

Características como aumento de sensibilidade e redução de interferências devido a técnica de geração de hidretos, ampliaram o seu campo de aplicação principalmente no acoplamento com técnicas de HPLC-ICP OES,^{73,113} HPLC-ICP-MS,^{127,128} e CE-ICP-MS.¹²⁹

2.4.2.4. Espectrometria de massa

A identificação de compostos de arsênio tem melhorado após a obtenção de informações utilizando a espectrometria de massa.² Nos últimos anos, a espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ES-MS) vem tornando-se uma técnica muito eficiente na especiação de arsênio, que pode ser utilizada, separadamente ou combinada com HPLC^{93,130} Ao contrário das técnicas de ICP-MS, ICP OES, AAS e AFS, onde arsênio elementar é detectado, a técnica de ES-MS pode fornecer informações moleculares dos compostos de arsênio.² Devido a essa importante informação estrutural fornecida pela ES-MS, um grande número de estudos vem focando seus objetivos na identificação de compostos orgânicos de arsênio, como arsenoaçúcares e novas espécies de arsênio.^{94,128}

Pergantis *et al.*¹³¹ determinaram 10 compostos orgânicos de arsênio utilizando HPLC acoplada a um ES-MS-MS. Os compostos de arsênio que, por ventura, foram co-eluídos da coluna, puderam ser diferenciados devido ao uso da MS-MS. O método foi utilizado para análise de urina, onde AsB foi determinada na faixa de $\mu\text{g l}^{-1}$. Ambos os métodos, HPLC-ICP-MS e HPLC-ES-MS, foram utilizados para

caracterizar e quantificar espécies de arsênio em alga.¹³² Nos extratos das algas foram identificadas quatro espécies de arsenoaçúcares juntamente com traços de As(V) e DMA, sendo que a identidade dos arsenoaçúcares foi confirmada por HPLC-ES-MS.

Pedersen e Francesconi¹³³ utilizaram um fragmentador com voltagem variável para obter dados do espectro de massa elementar e molecular de compostos de arsênio em dois tipos de algas. O método utilizando HPLC-ES-MS foi aplicado na determinação de quatro espécies de arsenoaçúcares, DMA e AsB.

2.4.2.5. Espectrofotometria

Os métodos espectrofotométricos, usados para a determinação seletiva de arsênio, são geralmente aplicados somente para as espécies inorgânicas. Eles baseiam-se na formação de complexos coloridos com certos ligantes. Por exemplo, As(III) forma um complexo colorido com dietilditiocarbamato de prata,¹³⁴ enquanto As(V) forma o complexo de cor azul arsênio-molibdênio.¹³⁵ Alguns métodos utilizam agentes oxidantes como permanganato¹³⁵ ou iodato¹³⁶ para converter todas as espécies de arsênio presentes na amostra à As(V), formando um complexo azul que absorve a 865 nm. O LD para cada espécie foi de 5 µg l⁻¹. Melhores limites de detecção (na ordem de 2 µg l⁻¹) foram obtidos, reagindo quantitativamente o As(III) com iodato de potássio na presença de ácido sulfúrico.¹³⁷

Palanivelu *et al.*¹³⁸ descreveram um método espectrofotométrico com boa sensibilidade para a determinação de arsenito e arsenato em amostras sintéticas, água potável e água do mar. Tamari *et al.*¹³⁹ desenvolveram um método baseado na co-precipitação para a determinação de arsenito e arsenato em amostras de água subterrânea. Ambas as espécies foram co-precipitadas com hidróxido de tório(V) em pH 9, sendo posteriormente centrifugadas e diluídas em HCl para efetuar as medições.

2.4.2.6. Métodos eletroanalíticos

Entre os métodos eletroquímicos, a polarografia de pulso diferencial é a

técnica que mais oferece possibilidades de quantificação de ambos os estados de oxidação do arsênio.¹¹⁸ O procedimento é baseado no fato que somente o As(III) é eletroativo e diretamente determinado utilizando ácido perclórico ou clorídrico como eletrólito suporte,¹⁴⁰ enquanto o arsênio inorgânico total é determinado após a redução, em solução, com dióxido de enxofre (SO₂). O SO₂ foi escolhido como agente redutor por que ele reduz o As(V) rapidamente e quantitativamente. No caso de amostras com baixas concentrações (ambientais e clínicas, por exemplo) o procedimento é sujeito a interferências de muitos elementos presentes na matriz, como Fe(II) e Cu(II). A determinação de espécies metiladas também é possível por métodos voltamétricos após separação por IC. Os limites de detecção para MMA e DMA foram de 18 e 8 µg l⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, antes da obtenção do sinal analítico e depois da separação das espécies existem etapas como digestão de cada fração com ácido perclórico a quente, redução com SO₂ e remoção do excesso de reagentes, onde cada etapa é suscetível a erros.

Porém, em vista de todas as dificuldades mencionadas, especialmente as que dizem respeito a interferências devido a matrizes complexas ou a presença de certos elementos, os métodos eletroquímicos não são usados para análise de rotina na especiação e determinação de arsênio em amostras com matrizes complexas.¹¹⁸

2.5. CROMATOGRAFIA DE ÍONS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

A técnica de ICP-MS é muito utilizada para a detecção de elementos traço em geral, particularmente eluentes cromatográficos. A ICP-MS oferece grandes vantagens como um detector para cromatografia a líquido, pois combina especificidade elementar, ampla faixa linear e baixos limites de detecção.¹⁴¹

Sistemas *on line*, onde detectores seletivos são conectados diretamente ao sistema de separação, fornecem resultados mais rapidamente quando comparados a sistemas *off line*. Além disso, os riscos de perda dos analitos ou contaminação são reduzidos, pois não há necessidade de nenhuma etapa de coleta ou armazenamento das frações que saíram da coluna cromatográfica.¹⁴²

Alguns dos problemas no acoplamento entre as duas técnicas podem estar relacionados com os eluentes. A alta concentração salina da fase móvel pode levar

a problemas de formação de depósitos de material (sais, óxidos etc.), principalmente na interface do instrumento de ICP-MS, bem como mudanças na ionização do analito. A adição de solventes orgânicos (metanol, acetonitrila etc.) também pode apresentar problemas na estabilidade do plasma e na ionização.¹⁴¹

2.5.1. Cromatografia de íons

Simples fatores, como interações entre cargas, podem apresentar influência na retenção e separação das espécies em IC. Quando espécies organometálicas são cromatografadas, interações hidrofóbicas entre os analitos e a parte não iônica de carbono da fase estacionária causam a retenção de íons orgânicos que, de certa maneira, é uma característica da cromatografia com fase reversa. Se o analito é carregado, as interações podem apresentar um comportamento onde há uma combinação entre fase reversa e troca iônica. A retenção de espécies da amostra em uma coluna e a eficiência resultante da coluna são, principalmente, dependentes da taxa de difusão do analito na coluna. A taxa de difusão na coluna, por sua vez, depende do tamanho e porosidade da resina e da viscosidade do eluente. O tamanho do poro das partículas da resina é um parâmetro importante para se obter uma boa separação.¹⁴³

Ao utilizar um solvente orgânico com concentração inferior a 10%, pode haver influência na seletividade da separação, afetando o mecanismo que controla as interações hidrofóbicas do soluto com a matriz.¹⁴¹

A IC pode ser vista como uma versão da HPLC, onde se utiliza uma coluna de troca iônica. A técnica é amplamente usada para a especificação de íons metálicos orgânicos e inorgânicos, em função do desenvolvimento de vários tipos de colunas, tornando a técnica como uma das melhores para especificação de íons metálicos. Em IC, são utilizadas colunas de troca aniônica e catiônica, mas atualmente, colunas mistas (troca aniônica e catiônica) também são utilizadas, comprovando a eficiência da técnica. Na cromatografia de troca catiônica, a fase estacionária é, usualmente, composta de resinas contendo grupamentos sulfônico ou carboxílico. Estes grupamentos, em determinado pH, ionizam, ficando com carga negativa, fazendo com que as espécies metálicas catiônicas sejam atraídas para a fase estacionária através de interações eletrostáticas. Já na cromatografia de troca aniônica, a fase

estacionária é, geralmente, constituída de grupamentos amina primária e quaternária com carga positiva e, conseqüentemente, os grupos da fase estacionária atraem solutos com carga negativa. Geralmente, a separação cromatográfica de íons metálicos em colunas de troca aniônica requer a presença de espécies negativamente carregadas.²³ Baseados nas características iônicas dos compostos de arsênio, a troca aniônica é mais comumente utilizada para separar As(III), As(V), MMA e DMA, enquanto que a troca catiônica é mais usada para separar as espécies AsB, AsC, TMA e TMAO.²

Similarmente à cromatografia por par iônico, As(III) e AsB são eluídos simultaneamente, em função da pouca interação com a fase estacionária, em pH neutro. Porém, As(III) pode formar um complexo, quando ácido tartárico é utilizado como fase móvel, e havendo a formação deste complexo, o As(III) pode ser separado da AsB.²

O acoplamento da IC com detectores é similar a HPLC. Técnicas eletroanalíticas, condutométrica, espectrométricas (OES, AAS, MS), etc. são usados para a detecção de espécies metálicas.²³

A especiação de arsênio em água do mar, por exemplo, torna-se difícil por IC em função da alta força iônica desta amostra. Para este tipo de aplicação, a seletividade da separação pode ser melhorada pelo uso de agentes quelantes na fase móvel. Na IC com utilização de quelantes em solução, a formação de complexos é responsável pela separação, e não a interação eletrostática. Para obter-se uma fase estacionária apropriada podem ser seguidas duas abordagens: (i) ligação química dos grupos quelantes ao substrato e (ii) recobrimento do substrato com um ligante que é permanentemente aprisionado no substrato.²³

2.5.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

O princípio da técnica de ICP-MS é baseado no uso de um plasma a alta temperatura capaz de gerar íons positivamente carregados, e o instrumento é composto de quatro partes principais:¹⁴⁴ sistema de introdução de amostra, tocha, interface e o espectrômetro de massa. Na Fig. 3 está representado o esquema de um instrumento de ICP-MS.

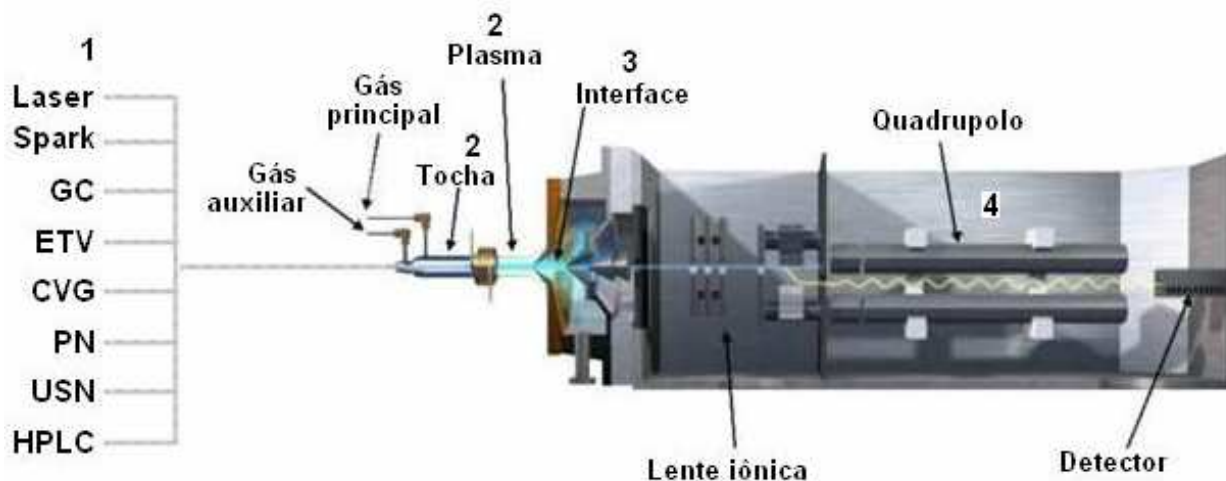


Figura 3. Esquema de um instrumento de ICP-MS. 1. sistema de introdução de amostra; 2. tocha e plasma; 3. interface e 4. espectrômetro de massa.

A amostra é introduzida, na maioria dos casos, na forma líquida, bombeada até o sistema de introdução de amostras no plasma, que é composto de uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização. Ela emerge, com auxílio da bomba peristáltica, da câmara de nebulização do nebulizador como um aerossol, e através de um tubo injetor chega à base do plasma. Em razão das diferentes zonas de temperatura do plasma, a amostra é seca, vaporizada, atomizada e ionizada, sendo transformada de um aerossol líquido para partículas sólidas e então em um gás ionizado. Quando a amostra finalmente chega à zona analítica do plasma, com temperatura em torno de 6000 a 7000 K, há apenas átomos e íons no estado gasoso. A excitação do elétron mais externo de um átomo no estado fundamental, emitindo radiação em um comprimento de onda específico, é a base da emissão atômica. Porém, há energia suficiente no plasma capaz de remover elétrons do átomo e gerar um íon. A geração, transporte e detecção de um número significativo desses íons carregados positivamente, é que leva ao ICP-MS a capacidade de detecção ultra-traço.¹⁴⁵

Para uma melhor detectabilidade em ICP-MS, íons devem ser produzidos eficientemente, sendo dependente da forma de introdução de amostras, a qual pode ser feita na forma sólida, líquida ou gasosa.¹⁴⁶ O método mais conveniente para introdução de amostras líquidas no fluxo de gás é através de um nebulizador. Para melhorar o desempenho da técnica foi necessário introduzir uma câmara de nebulização junto ao nebulizador, cuja função é a de remover gotículas maiores, as

quais prejudicam a estabilidade (ou levam à extinção) do plasma. Os tipos de nebulizadores mais comuns utilizados em ICP-MS são os pneumáticos e ultrasônicos. Entre os tipos de nebulizadores pneumáticos, os modelos mais utilizados são o concêntrico, de fluxo cruzado (*cross flow*) e Babington, onde a vazão (da solução) de operação é em torno de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.^{144,147} A câmara de nebulização, responsável pela separação das gotículas geradas pelo nebulizador (somente gotas com diâmetro inferior a aproximadamente $10 \mu\text{m}$ chegam ao plasma), basicamente, é de dois tipos, a câmara de nebulização ciclônica e a duplo passo.

A geração de um plasma indutivamente acoplado depende de alguns componentes básicos: uma tocha, uma bobina de indução da radiofrequência (RF) e uma fonte de RF. Na Fig. 4 está mostrada uma vista detalhada desses componentes e a interface com o espectrômetro de massa. A tocha consiste em três tubos concêntricos (tubo externo, intermediário e injetor), geralmente de quartzo, onde o gás (usualmente argônio) de formação do plasma passa entre o tubo exterior e o intermediário a uma vazão de $12 \text{ a } 17 \text{ l min}^{-1}$. O segundo gás (gás auxiliar) passa entre o tubo intermediário e o injetor, e é usado para dar forma ao plasma e mantê-lo afastado dos tubos internos da tocha. O terceiro gás (gás de nebulização) é responsável pela formação e introdução do aerossol no plasma. Ambos os gases, auxiliar e de nebulização, operam em vazões em torno de 1 l min^{-1} .^{146,147}

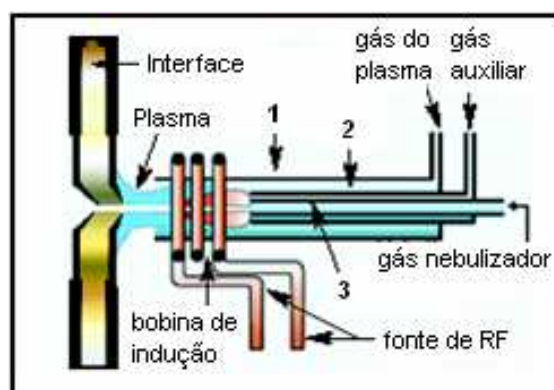


Figura 4. Vista detalhada da tocha, plasma e interface. 1. tubo externo; 2. tubo intermediário e 3. tubo injetor.¹⁴⁸

Quando uma determinada potência (entre 750 e 1500 W) é aplicada pelo gerador de RF na bobina de indução, a corrente alternada da bobina, com frequência correspondente à do gerador de RF (27 ou 40 MHz), faz com que o plasma seja mantido. Essa oscilação na bobina causa um intenso campo

eletromagnético na extremidade da tocha. Com o argônio fluindo pela tocha, uma descarga elétrica de alta voltagem é aplicada no gás, gerando elétrons e íons argônio. Esses elétrons e íons, quando alcançam a região do interior da bobina de RF, oscilam de acordo com o campo eletromagnético, colidindo com outros átomos de argônio. Essas colisões induzem a uma ionização contínua, formando o plasma.^{146,148}

A amostragem e o transporte eficiente dos íons do plasma a pressão atmosférica (760 Torr) até o analisador de massa (10^{-6} Torr) é feita pela interface pela redução de pressão através da aplicação de vácuo. Ela consiste em dois cones metálicos com orifícios muito pequenos (na ordem de 1 mm de diâmetro). Após a geração dos íons no plasma, eles passam pelo primeiro cone (cone de amostragem) e, logo após, pelo segundo cone (*skimmer*). Após a passagem dos íons pelo “*skimmer*”, devido à expansão, há a necessidade de que os mesmos sejam focados para garantir sua chegada até o analisador de massa. Os íons são focados pela ação de uma lente iônica ou conjunto de lentes iônicas, que consiste de um cilindro (ou uma série de cilindros ou placas perfuradas) metálico oco submetido a uma diferença de potencial (normalmente na faixa de 2 a 15 V de corrente contínua).^{144,149}

Grande parte dos instrumentos de ICP-MS comercializados atualmente utiliza o quadrupolo como separador dos íons. O quadrupolo consiste em quatro barras metálicas cilíndricas ou hiperbólicas de mesmo comprimento e diâmetro. Pela aplicação combinada de corrente contínua (cc) e de corrente alternada (ac) aos eletrodos (quadrupolo), somente os íons com uma determinada razão massa/carga (m/z) são conduzidos através do quadrupolo. Os demais íons colidem com os eletrodos ou são ejetados do interior do quadrupolo. Desta forma, os íons são sequencialmente separados pelo quadrupolo. Vários tipos de detectores podem ser utilizados para coletar os íons na saída do quadrupolo e converter em sinal elétrico, mas os mais populares são os de dinodos discretos, copo de Faraday (*Faraday Cup*) e “Chaneltron”.^{144,146}

Assim como em outras técnicas espectrométricas, a técnica de ICP-MS possui interferências espectrais e não-espectrais. As interferências espectrais são dependentes da espécie presente e podem ser divididas em quatro tipos principais: poliatômicas, isobáricas, íons de carga dupla e íons de óxidos refratários. As interferências não-espectrais podem surgir por vários motivos: deposição sobre os

cones de amostragem, presença de outro elemento facilmente ionizável, efeito espaço carga, entre outros.¹⁴⁴

2.5.3. Especificação de arsênio empregando LC-ICP-MS

A separação de espécies de arsênio é feita, principalmente, através da cromatografia de troca aniônica. Porém, alguns trabalhos de especificação de arsênio também utilizam colunas de troca catiônica ou colunas trocadoras mistas.²³ Martin *et al.*¹⁵⁰ desenvolveram um sistema *on line* utilizando cromatografia íons e oxidação assistida por microondas acoplados a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) utilizando diferentes tipos de colunas. Os autores identificaram e quantificaram As(III), As(V), MMA, DMA, AsB e AsC em água e sedimentos. Estudaram as técnicas de cromatografia de troca aniônica (coluna Hamilton PRP-X100 e $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Na}_3\text{PO}_4$ como fase móvel) e por par iônico (fase móvel fosfato de tetrabutylamônio), sendo que os limites de detecção foram de 97 a 143 $\mu\text{g l}^{-1}$ e 10 a 30 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. As recuperações obtidas foram de 98 a 105%, quando utilizados extratos sintéticos de sedimentos.

Em estudo desenvolvido por Zheng *et al.*,¹⁵¹ foi possível separar, em 15 min, as espécies AsC, AsB, DMA, MMA, As(III) e As(V) utilizando ácido tartárico a pH 2,9 como fase móvel. Utilizando pH 9,0 foi possível separar AsB de As(III), com carbonato de amônio (30 mol l^{-1}) como fase móvel.⁸³ Alternativamente, para remover a interferência de As(III) na determinação de AsB, foi sugerida a oxidação de As(III) a As(V) antes da etapa de separação.¹⁵²

Utilizando uma coluna IonPac[®] AS14, Lintschinger *et al.*¹⁵³ separaram As(III), As(V), MMA, DMA e AsB utilizando eluição por gradiente com 0,002 mol l^{-1} de hidróxido de tetrametilamônio e 0,01 mol l^{-1} de carbonato de amônio como fase móvel (binária). Foram analisadas amostras de urina diluídas 1:5 (v/v) devido a problemas de interferência da matriz da amostra. O tempo total de análise foi de 10 min. Em outro estudo, foi feita a separação de MMA e DMA, em uma coluna de troca aniônica, com ácido cítrico como fase móvel. Foram analisadas 400 amostras de urina na região de West Bengal (Índia) afetada pela contaminação de arsênio.¹⁵⁴

Tsalev *et al.*¹²⁴ acoplaram IC a foto-oxidação UV (*on line*) a um instrumento de HG AAS para a especificação de As(III), MMA, DMA, TMAO, TMA, AsB e AsC.

Segundo os autores, as colunas que apresentaram os melhores resultados foram as de troca aniônica, como a Hamilton PRP-X100 e Supelcosil SAX 1, e eluição por gradiente com tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$). Dentre os parâmetros estudados destacam-se a vazão da fase móvel, a concentração e vazão dos reagentes, as condições da separação cromatográfica, o efeito do agente anti-espumante, entre outros. O sistema HPLC-UV-HG AAS apresentou limites de detecção na ordem de 2 a $6 \mu\text{g l}^{-1}$ para análise de amostras de urina e materiais de referência certificados (CRM's).

Mattusch e Wennrich¹⁵⁵ desenvolveram metodologia para a separação MMA, DMA, TMAO, brometo de TMA, AsB e AsC. Para a determinação das espécies inorgânicas, eles utilizaram uma coluna de troca aniônica (IonPac[®] AS4-SC) e $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ de carbonato de sódio, $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ de hidróxido de sódio e 4% de metanol como fase móvel. Para a separação das espécies aniônicas, neutras e catiônicas de arsênio, os autores utilizaram eluição por gradiente com HNO_3 (com variação da concentração de $0,0005$ a $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ durante a eluição), e uma coluna IonPac[®] AS7. A detecção de todas as espécies de arsênio foram feitas em um instrumento de ICP-MS, e os limites de detecção variaram de $0,3$ a $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$, dependendo da espécie.

Slejkovec *et al.*¹⁵⁶ desenvolveram um sistema acoplando IC a um espectrômetro de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS) para a determinação de As(III), As(V), MMA e DMA em aerossol urbano. As amostras foram coletadas através de sucessivas filtrações em filtros de membrana, e então, passando por um procedimento de extração que permite diferenciar as espécies extraíveis em água, extraíveis em fosfato e compostos refratários. Os autores observaram uma grande dependência do tamanho da partícula em relação ao tipo de extrator utilizado para cada espécie. Foi utilizada uma coluna de troca aniônica (Adsorbosphere[®] SAX) e $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ de KH_2PO_4 a pH 6,0 como fase móvel.

Gettar *et al.*¹¹³ desenvolveram uma metodologia para a determinação de As(III), As(V), MMA e DMA em águas subterrâneas e de rio utilizando IC. Diferentes tamanhos de colunas de troca aniônica, sílica e polimérica, foram testadas utilizando EDTA como eluente. As melhores condições foram obtidas utilizando a separação por cromatografia íons acoplada a um gerador de hidretos (reação com NaBH_4 em meio ácido) e detecção por ICP-MS. Os limites de detecção obtidos foram entre 10 e $65 \mu\text{g l}^{-1}$.

Bissen e Frimmel²⁵ determinaram As(III), As(V), MMA e DMA em extratos de solos contaminados, por HPLC-ICP-MS. O processo de extração adotado baseou-se no pH da solução extratora semelhante ao do ambiente. Por exemplo, 0,3 mol l⁻¹ de (NH₄)₂C₂O₄ (pH 3,0), água deionizada (pH 5,8), 0,3 mol l⁻¹ de Na₂CO₃ (pH 8,0) e 0,3 mol l⁻¹ de NaHCO₃ (pH 11,0). Para a separação das espécies de As utilizaram uma coluna-guarda IonPac[®] AG11 e uma coluna IonPac[®] AS11, com separação por gradiente e NaOH (variação da concentração de 0,002 a 0,05 mol l⁻¹ durante a eluição) como eluente.

Lindemann *et al.*,⁵⁹ além de especiar As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, ácido fenilarsônico (PAA) e algumas espécies de Sb, Se e Te, também estudaram a estabilidade destes compostos. Para a separação das espécies em água, peixe, solo e urina, os autores utilizaram como fase móvel NH₄HCO₃ a 0,002 mol l⁻¹ e um gradiente com ácido tartárico (0,0022 a 0,045 mol l⁻¹ durante um período de 6 a 7 min, linearmente). Os autores observaram que, ao preservar a amostra ao abrigo da luz e a temperatura de 3 °C, as espécies de As são estáveis até 2 semanas. Eles utilizaram uma coluna IonPac[®] AS14 e volume de injeção de 50 µl.

Schimdt *et al.*¹⁵⁷ estudaram a aplicação da extração com líquido pressurizado (PLE) e, posteriormente, determinaram As(III), As(V), MMA, DMA, TMA, TMAO, AsB e AsC em vegetais. A fase móvel utilizada foi HNO₃ (de 0,0005 a 0,05 mol l⁻¹) e para a detecção das espécies eles utilizaram um instrumento de ICP-MS. Além de testar o tempo de extração, o número de etapas de extração e a temperatura, eles também estudaram a estabilidade das espécies orgânicas e inorgânicas durante a etapa de extração (temperatura de 60 a 180 °C). Observaram uma baixa reprodutibilidade, tanto para as amostras, quanto para os CRM's e, também, a grande influência exercida pela temperatura na estabilidade das espécies.

Roig-Navarro *et al.*¹⁵⁸ desenvolveram uma metodologia para a especiação de As(III), As(V), MMA e DMA em água através acoplamento entre IC e ICP-MS. O tempo de eluição necessário para a separação das quatro espécies de arsênio e Cr(VI) utilizando uma coluna Hamilton PRP-X100 (NH₄HCO₃), foi em torno de 9 min, com eluição por gradiente. Ao utilizar uma coluna ION120, obtiveram uma boa separação entre as espécies utilizando NH₄HCO₃ (pH 8) ou NH₄H₂PO₄ (pH 6) como fase móvel. Os autores investigaram a estabilidade das espécies, comprovando que, se conservadas sob refrigeração, as espécies são estáveis até 15 dias, exceto para As(III) e As(V). Os limites de detecção foram na ordem de 0,02 a 0,05 µg l⁻¹ para

arsênio e $5,5 \mu\text{g l}^{-1}$ para Cr(VI).

Martinez-Bravo *et al.*¹⁵⁹ desenvolveram um método para separação cromatográfica simultânea de As(III), As(V), MMA, DMA, Se(IV), Se(VI) e Cr(VI) em água e detecção por ICP-MS. Foi utilizada como fase móvel uma solução de NH_4NO_3 nas concentrações de $0,02$ e $0,06 \text{ mol l}^{-1}$ e pH 8,7. São necessários 14 min para a separação de todas as espécies. No ajuste do sistema de separação foram avaliados, a composição da fase móvel, o pH e a força iônica. Para a separação foi utilizado uma coluna de troca aniônica Hamilton PRP-X100 (250 x 4,1 mm) e volume de injeção de $100 \mu\text{l}$, sendo que os limites de detecção para as espécies de arsênio foram de $0,04$ a $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$, com recuperação de 91 a 99%.

Day *et al.*¹⁶⁰ adequaram as condições de separação para a análise de especiação de As(III), As(V), MMA e DMA. Para a separação das espécies foi utilizada uma coluna de troca aniônica (250 x 4,6 mm) e $0,002 \text{ mol l}^{-1}$ de NaH_2PO_4 e $0,0002 \text{ mol l}^{-1}$ de EDTA a pH 6 como fase móvel. O tempo necessário para a separação das quatro espécies foi de 10 min para um volume de injeção de $100 \mu\text{l}$.

Van Hulle *et al.*¹⁶¹ utilizaram colunas de troca aniônica (Hamilton PRP-X100/ $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e NH_4HCO_3 como fase móvel) e troca catiônica (IonPac CS-10/piridina como fase móvel) acopladas a um instrumento de ICP-MS. Foi feita a análise de especiação de arsênio em extrato de alga, e para a confirmação estrutural das espécies de arsênio, foi feita a determinação por ES-MS, após separação prévia das espécies em uma coluna Hamilton PRP-X100 e NH_4HCO_3 em metanol como fase móvel. Foi possível a identificação de DMA e algumas espécies de arsenoaçúcares.

Zhang *et al.*¹²⁵ utilizaram LC para separação de MMA, DMA, AsB e AsC em soro sanguíneo após digestão por foto-oxidação com radiação UV. Os autores utilizaram uma coluna IonPac[®] CS-10 com NaH_2PO_4 e HCl como fase móvel, e para a detecção das espécies um instrumento de HG AAS. A determinação das espécies foi feita em um período de 10 min e com LD variando de $1,0$ a $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$, dependendo da espécie.

Cornelis *et al.*¹⁶² determinaram DMA e AsB em urina liofilizada com auxílio de LC acoplada a um sistema de HG AAS. Como forma de tratamento das amostras para posterior detecção, foi feita a oxidação das espécies orgânicas por meio de radiação UV e com o auxílio de persulfato de sódio em meio alcalino. Foi empregada uma coluna de troca catiônica IonPac[®] CS-10, e como fase móvel $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de HCl

e $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ de NaH_2PO_4 . Nestas condições, os autores não conseguiram uma separação satisfatória entre MMA e as espécies inorgânicas. A validação do método foi feita com a utilização de CRM's e os limites de detecção foram de $1,3$ a $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$.

Vela *et al.*³⁴ utilizaram ASE para extração de As(III), As(V), MMA, DMA e AsB em cenoura, para posterior separação das espécies em uma coluna de troca aniônica fraca. Foram otimizados parâmetros como, o agente dispersante, tempo de extração, número de ciclos de extração, tamanho de partícula e temperatura de extração. Foi utilizada uma coluna IC-Pak Anion HR (75 x 4,6 mm) e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ a pH 10, como fase móvel. A detecção das espécies, e determinação da concentração total de arsênio, foram feitas em um instrumento de ICP-MS, sendo que os LD para a análise de especiação foram de $0,11$ a $0,24 \mu\text{g l}^{-1}$.

Kohlmeyer *et al.*¹⁶³ desenvolveram um método para a determinação de espécies inorgânicas (As(III) e As(V)) e orgânicas (MMA, DMA, TMA, TMAO, AsB, AsC e várias espécies de arsenoaçúcares) em peixe, mexilhão, ostra e alga. Para a extração das espécies foi utilizada uma mistura metanol:água, obtendo uma eficiência entre 83 e 107%. Foram determinadas 17 espécies (em 15 min) após eluição por gradiente (HNO_3 e um reagente par iônico como fase móvel) com a utilização de uma coluna de troca aniônica IonPac[®] AS7 (250 x 4 mm). A detecção foi feita por ICP-MS.

Pantsar-Kallio *et al.*¹⁶⁴ propuseram um método para determinar espécies de arsênio presentes em amostras de água utilizando a técnica de IC-ICP-MS. Obtiveram boa separação entre As(III) e As(V), mas o método foi aplicado, também, para a determinação de espécies menos tóxicas como MMA, DMA, AsB e AsC. Para todas as espécies os LD foram na faixa de $0,4$ a $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

As determinações de arsênio foram feitas por ICP-MS empregando-se um espectrômetro da PerkinElmer SCIEX (modelo ELAN[®] DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, USA), equipado com nebulizador pneumático (Meinhard[®] tipo A, <http://www.meinhard.com>, USA) com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., <http://www.geicp.com>, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. O plasma foi gerado a partir de argônio (99,998% de pureza, White Martins, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil).

Para a separação das espécies de arsênio, utilizou-se um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para cromatografia a líquido (PerkinElmer, modelo Series 200 LC Pump) e um degaseificador à vácuo (PerkinElmer, modelo Series 200 Vacuum Degasser), uma coluna de troca aniônica Dionex (IonPac[®] AS14, 250 x 4 mm d.i., 9 µm de diâmetro de partícula, <http://www.dionex.com>, USA) e uma coluna guarda Dionex (IonPac[®] AG14, 50 x 4 mm d.i., 9 µm de diâmetro de partícula). Na Fig. 5 está mostrado o esquema instrumental LC-ICP empregado para a especificação de arsênio.

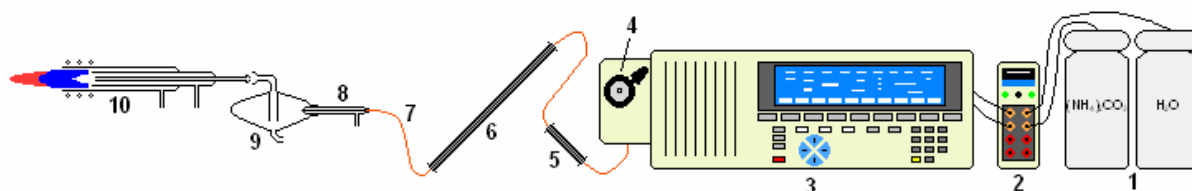


Figura 5. Esquema do sistema LC-ICP. 1. fase móvel; 2. degaseificador a vácuo; 3. bomba de LC; 4. injetor; 5. coluna guarda (troca aniônica); 6. coluna analítica (troca aniônica); 7. tubos de PEEK; 8. nebulizador; 9. câmara de nebulização e 10. plasma.

O pH das soluções foi medido em potenciômetro digital (Metrohm, modelo 781 pH/Ion Meter, <http://www.metrohm.com>, Suíça), com resolução de 0,01 unidades de pH, equipado com eletrodo de vidro combinado (Metrohm, modelo 6.0258.010) e com sensor de temperatura.

Em vista da indisponibilidade de material de referência certificado (CRM) com características semelhantes ao da amostra estudada, tanto em relação à concentração de As total, quanto a espécies de As, foram feitas determinações da concentração total de As por ICP-MS, por ICP OES (espectrômetro da Spectro, modelo Ciros CCD, <http://www.spectro-ai.com>, Alemanha) e por GF AAS (instrumento da Analytik Jena, modelo AAS5 EA, <http://www.analytik-jena.de>, Alemanha).

A determinação de As total por ICP OES foi feita em 189,042 nm e com vista axial de observação do plasma. O equipamento é equipado com nebulizador de fluxo cruzado (*cross flow*) e câmara de nebulização duplo passo, confeccionada em vidro. A potência do plasma foi de 1500 W e as vazões do gás principal, auxiliar e nebulizador foram de 12, 0,95 e 1,12 l min⁻¹, respectivamente. A vazão da solução amostra foi de 1,2 ml min⁻¹. A determinação de As total por GF AAS foi feita a 193,7 nm e fenda espectral de 0,8 nm, empregando lâmpada de cátodo oco como fonte de radiação específica e corretor de fundo baseado em lâmpada de deutério. O programa de temperatura/tempo do forno de grafite empregado foi o seguinte: secagem a 110 °C por 10 s com rampa de aquecimento de 2 °C s⁻¹, pirólise a 900 °C por 45 s com rampa de aquecimento de 250 °C s⁻¹, atomização a 2200 °C por 10 s com rampa de aquecimento de 3000 °C s⁻¹ e limpeza a 2500 °C por 4 s com rampa de aquecimento de 3000 °C s⁻¹. Paládio (2 µg) foi usado como modificador para amostras e soluções de referência.

3.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada, deionizada em uma coluna trocadora de íons e purificada em um sistema Milli-Q® (Millipore, <http://www.millipore.com>, USA), com resistividade de 18,2 MΩ cm.

As soluções de referência para a determinação de As total, Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn, foram preparadas a partir de soluções estoque multi-elementares (Spex CertiPrep[®], <http://www.spexcsp.com>, USA - CLMS-2 e CLMS-4 a 10 mg l⁻¹ em HNO₃ 5% v/v). Foram preparadas soluções estoque contendo 1000 mg l⁻¹ de As a partir da dissolução de DMA (Sigma, <http://www.sigma.com>, USA), As(V) (Riedel-de Haën, <http://www.riedelhaen.com>, Alemanha) e As(III) (Merck, <http://www.merck.com>, Alemanha) em água. Soluções estoque a 1000 mg l⁻¹ de As foram preparadas a partir da dissolução de ácido p-arsanílico (p-ASA, Sigma) e AsB, sintetizada e cedida por Walter Goessler (Institute for Chemistry - Analytical Chemistry, Karl Franzens Universität Graz, Universitätsplatz 1, 8010, Graz, Áustria),¹⁶⁵ em amônia a 10% v/v. Para preparar as soluções de calibração do instrumento, foram feitas diluições adequadas das soluções estoque em água, sendo estas preparadas diariamente. Solução estoque de cloreto a 1000 mg l⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de NaCl (Merck) em água.

A fase móvel (carbonato de amônio) foi preparada, diariamente, a partir da dissolução de (NH₄)₂CO₃ p.a. (Merck) em água. O pH da fase móvel foi ajustado com ácido nítrico a 65%, m/v (Carlo Erba, cód. 408022, <http://www.carloerbareagenti.com>, Itália), o qual foi previamente bidestilado em sistema de sub-ebulição Milestone (modelo duoPUR[®] 2.01E, <http://www.milestonesci.com>, Itália) ou amônia com teor mínimo de 25% v/v de NH₃ (Merck). Para a calibração do potenciômetro foram utilizadas soluções tampão (CertiPUR[®], Merck) com valores de pH 4,00 ± 0,02 (20 °C) e 7,00 ± 0,02 (20 °C).

A coluna cromatográfica foi regenerada periodicamente com solução de H₂SO₄ a 0,025 mol l⁻¹, preparada a partir da diluição de H₂SO₄ 95 a 98% m/v (Synth, <http://www.synth.com.br>, Brasil) em água.¹⁶⁶

3.3. MATERIAIS DIVERSOS

A injeção das soluções no cromatógrafo foi feita com a utilização de uma seringa (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha) com capacidade para 1 ml e com filtro de acetato de celulose acoplado entre a seringa e a agulha (Alltech, <http://www.alltech.nl>, Holanda), com 13 mm de diâmetro e 0,2 µm

de tamanho de poro. Foram utilizados tubos de poliéter éter cetona (PEEK) (Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>, USA) com 0,56 mm (1/16") de diâmetro interno para interconectar a coluna cromatográfica com a bomba de LC e o nebulizador do instrumento de ICP-MS.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança eletro mecânica (Mettler Toledo, modelo AG245, <http://de.mt.com>, Alemanha) com resolução de 0,0001 g e tara máxima de 245 g.

Uma centrífuga com velocidade variável (Sigma, modelo 3k30, <http://www.sigma-zentrifugen.de>, Alemanha) e com capacidade para quatro frascos de 40 ml, foi utilizada para a separação dos sólidos em suspensão da amostra estudada.

Para a determinação de As total, a amostra foi previamente decomposta em sistema de decomposição pressurizado com aquecimento por radiação microondas (Anton Paar, modelo *Multiwave 3000*[®], <http://www.anton-paar.com>, Áustria), equipado com oito frascos de quartzo de 80 ml de capacidade. Este sistema possibilita trabalhar com temperatura e pressão máxima de até 280 °C e 80 bar, respectivamente, e permite controlar o tempo, temperatura, pressão e potência.

Para o armazenamento das amostras foram utilizados frascos de polipropileno (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha), com fundo cônico e com capacidade máxima de 50 ml. Estes frascos foram usados sem qualquer tratamento para limpeza.

Toda vidraria utilizada foi descontaminada por imersão em HNO₃ 20% v/v por um período de, no mínimo, 48 h e, posteriormente, enxaguada com água.

3.4. AJUSTE DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO INSTRUMENTO DE ICP-MS

Foi feito um ajuste diário das condições operacionais do instrumento de ICP-MS, o que envolve o ajuste da vazão do gás de nebulização e calibração da lente iônica, quando necessário. Este ajuste foi feito através do controle da intensidade do sinal para os íons M⁺ (monitorado através do ¹¹⁵In⁺, cuja resposta indicada pelo fabricante deve ser de, no mínimo, 30.000 contagens s⁻¹, cps), mínima produção de íons MO⁺ (monitorado através do sinal do íon poliatômico ¹⁵⁵LaO⁺, o qual deve ser inferior a 3% em relação ao íon ¹³⁹La⁺) e íons M²⁺ (razão entre ¹³⁸Ba²⁺ e ¹³⁸Ba⁺,

inferior a 3%). Estes ajustes foram feitos utilizando uma solução contendo $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de In e La e $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ba. Além disso, o ruído do instrumento deve ser inferior a 2 cps em m/z 8,5 e m/z 220.¹⁶⁷ Outros ajustes como, calibração do detector e calibração do quadrupolo (calibração de massa), por exemplo, são feitos com menor frequência, mas também foram feitas quando necessário, de acordo com as recomendações do fabricante.¹⁶⁷ As condições de operação selecionadas para o instrumento de ICP-MS são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de operação do instrumento de ICP-MS.

Potência RF	1400 W
Vazão de Ar: principal	15 l min^{-1}
intermediário	$1,20 \text{ l min}^{-1}$
nebulizador	$1,15 \text{ l min}^{-1}$
“ <i>Sampler</i> ” e “ <i>Skimmer</i> ”	Pt
Resolução	0,7 u
m/z monitorado	75
Varreduras/leitura	1
Replicatas	1
“Dwell time”	250 ms
Leituras/replicata	7114
Lente iônica	“ <i>Auto lens</i> ” (Off)
Modo de medida	“ <i>Peak hopping</i> ”
Modo de operação do detector	“ <i>Dual</i> ”
Modo de operação do instrumento	Sem DRC (<i>Standard</i>)
Tempo morto do detector	40 ns

3.5. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS

Foram feitos diversos testes para a otimização do sistema LC para ajustar as condições que influenciam na separação das espécies de As. Um ajuste mais minucioso foi feito em função do número de espécies de arsênio presentes nas soluções de referência (cinco espécies) e, principalmente, na amostra, cujo objetivo foi a separação adequada das espécies no menor tempo possível. Com a finalidade de obter essas condições para a quantificação das espécies de As foram avaliados

parâmetros como, tipo de eluição (por gradiente ou isocrática), pH, vazão e concentração da fase móvel. Estes parâmetros foram estudados de forma univariada com a utilização de soluções contendo $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de As para cada espécie.

3.5.1. Escolha da vazão e concentração da fase móvel

Os testes iniciais para a separação dos compostos de arsênio (As(III), As(V), AsB, *p*-ASA e DMA) foram feitos tomando-se, como referência, as condições empregadas por B'Hymer e Caruso,³⁷ os quais envolveram a avaliação da vazão, do pH e da concentração da fase móvel.

Como condição inicial utilizou-se vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, pH 8,5 da fase móvel e eluição isocrática com o seguinte programa: 100% da fase móvel A ($0,015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) durante 7 min e 100% da fase móvel B ($0,05 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) durante os 23 min restantes. Posteriormente, foi avaliada a influência da concentração da fase móvel de $0,0015$ a $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ durante os 7 min iniciais e de $0,005$ a $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ durante os 23 min finais da etapa de eluição. Para cada concentração testada, variou-se a vazão de $0,6$ a $1,6 \text{ ml min}^{-1}$. Neste caso, excepcionalmente, foram utilizadas soluções contendo $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de arsênio de cada espécie. A concentração da fase móvel e os tempos utilizados nestes experimentos foram escolhidos em função da separação das espécies de As.

3.5.2. Separação e identificação das espécies de arsênio

Para a separação e identificação das cinco espécies de arsênio estudadas (AsB, As(III), As(V), DMA, e *p*-ASA) foram determinados os tempos de retenção de cada espécie separadamente empregando soluções contendo as espécies individualmente e soluções mistas (contendo as cinco espécies de arsênio).

3.5.3. Estudo da influência do pH da fase móvel

Após a separação cromatográfica e identificação de cada uma das cinco espécies de arsênio, foi feito um estudo para avaliar a influência do pH da fase móvel na faixa de 7 a 10 na separação, tempo de retenção e ordem de eluição das espécies.

3.5.4. Estudo da influência da vazão da fase móvel

A vazão da fase móvel foi variada entre 0,8 e 1,6 ml min⁻¹ para verificar a sua influência na separação e resolução dos sinais das cinco espécies de arsênio estudadas.

3.5.5. Estudo da influência da concentração da fase móvel

Para avaliar a influência da concentração da fase móvel na separação das espécies de As, a etapa de eluição (previamente estabelecida como 30 min através de testes prévios) foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consiste na variação da concentração da fase móvel entre 0,0005 e 0,004 mol l⁻¹ durante os 5 min iniciais. A segunda etapa consiste na variação da concentração da fase móvel entre 0,002 a 0,018 mol l⁻¹ no intervalo entre 5 e 15 min. Para uma melhor separação entre as espécies, foi adicionada mais uma etapa, e os intervalos de tempo referentes a cada etapa foram modificados para 10 min cada.

3.5.6. Condicionamento da coluna cromatográfica

Após o final de cada etapa de eluição, verificou-se que era necessária uma etapa de condicionamento da coluna cromatográfica, uma vez que foi observado que a separação não era reprodutível quando não era feito o condicionamento da coluna. Para tal, o tempo de condicionamento foi avaliado passando-se a fase móvel pela coluna em diferentes intervalos de tempo (até no máximo 30 min).

3.6. AMOSTRA

A amostra de subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso foi coletada em frasco de vidro âmbar e armazenada sob refrigeração a 4 °C e ao abrigo da luz.

3.6.1. Tratamento preliminar da amostra

Em função da presença de sólidos (em suspensão e sedimentados) na amostra, a mesma foi agitada para homogeneização e deixada em repouso por uma hora para separação dos sólidos sedimentáveis. Parte da fração sobrenadante foi transferida para frasco de polipropileno de 50 ml e centrifugada por 10 min a 10000 rpm, para remoção dos sólidos suspensos. A solução obtida após centrifugação foi filtrada em filtro de acetato de celulose com porosidade média de 0,45 μm .¹⁶⁸

3.6.2. Caracterização da amostra

Inicialmente foram determinados o pH, o teor de sólidos totais (STS), demanda química de oxigênio (DQO) e OD oxigênio dissolvido (OD), na amostra estudada empregando metodologias oficiais.¹⁶⁸ Também foram determinadas as concentrações de Ag, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn, diretamente na amostra não filtrada, centrifugada e filtrada, bem como após a sua decomposição em sistema fechado em forno de microondas. Para a decomposição da amostra, foram transferidos 5 ml de HNO_3 para os frascos de quartzo do forno de microondas e adicionados 10 ml de amostra, e 1 ml de H_2O_2 concentrado. A mistura foi submetida ao seguinte programa de tempo e potência da radiação microondas: 10 min de rampa a 1200 W + 5 min a 1200 W. Após o arrefecimento dos frascos, a solução foi transferida para frascos de polipropileno e o volume aferido a 50 ml com água. A determinação de arsênio total foi feita por ICP-MS e ICP OES e GF AAS.

3.6.3. Análise de especiação de arsênio

Para a análise de especiação de arsênio, a qual envolve a separação e a quantificação das espécies, foi utilizado um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), conforme está representado na Fig. 6. O volume de injeção das soluções de referência e amostras foi fixado em 200 μl .¹⁶⁶

Na Fig. 6 está mostrado o fluxograma das principais etapas envolvidas na determinação da concentração total de arsênio e na análise de especiação de arsênio no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.

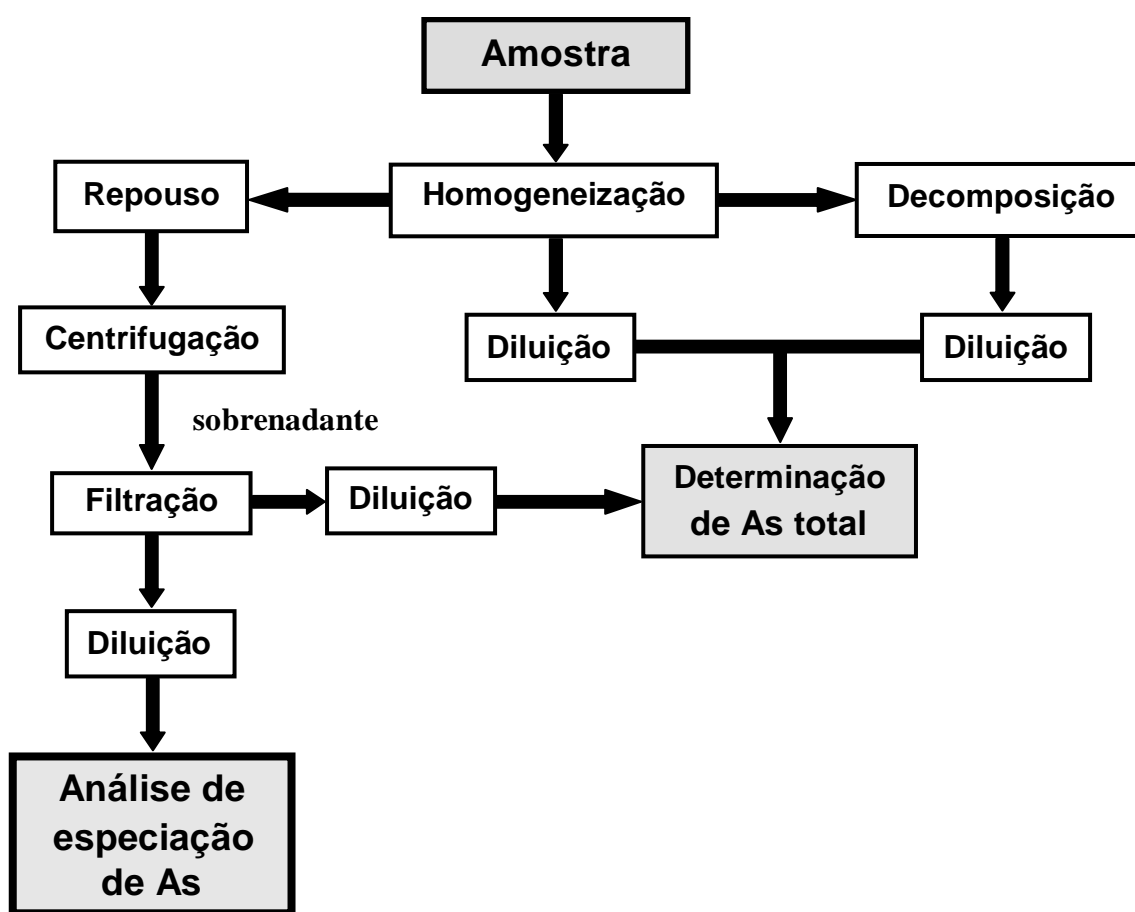


Figura 6. Procedimento geral do preparo da amostra para a determinação da concentração total e análise de especiação de arsênio no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.

3.6.3.1. Estudo de interferências espectrais na determinação de arsênio por LC-ICP-MS

Dentre os interferentes existentes na determinação de arsênio por ICP-MS, o cloreto é um dos principais, devido à formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, m/z 75.¹⁶⁹ Desta forma, foi estudada a possível interferência do cloreto na determinação das espécies de arsênio, avaliando-se concentrações entre 10 mg l^{-1} e 5000 mg l^{-1} de Cl^- . O estudo foi feito injetando $200 \mu\text{l}$ de solução contendo o interferente na ausência de As.

3.6.3.2. Validação do método proposto para análise de especiação de arsênio

O método proposto foi validado através de teste de recuperação das espécies de arsênio estudadas (As(III), As(V), AsB, *p*-ASA e DMA) no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso. As espécies de arsênio foram adicionadas antes de haver qualquer tipo de tratamento na amostra, com a finalidade de avaliar a influência sobre as espécies de As envolvendo todas as etapas do procedimento. Para avaliar a recuperação das espécies de arsênio, foram adicionadas diferentes concentrações de cada espécie, dependendo da diluição empregada (amostra concentrada ou diluída 10 vezes) e da concentração de cada espécie de arsênio determinada previamente.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO SUBPRODUTO AQUOSO DO PROCESSO DE PIRÓLISE DO FOLHELHO BETUMINOSO

Antes de se fazer a análise de especiação há a necessidade de conhecer os constituintes majoritários presentes na amostra, a fim de poder avaliar as possíveis fontes de interferências, riscos de conversão entre as espécies de As por processos de oxidação, redução ou ação de microorganismos, entre outros problemas que podem ocorrer com a amostra ou com o processo de separação e quantificação.²⁰ Devido às características da amostra (subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, cujo aspecto visual é escuro e turvo), fez-se uma análise dos constituintes principais, bem como uma caracterização físico-química da amostra, conforme mostrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso *in natura*.

	Amostra “ <i>in natura</i> ”
pH	10,1
Cor (mg l ⁻¹ Pt-Co)	2550
Turbidez (UT)	15,8
Condutividade (mS cm ⁻¹)	2,2
OD (mg l ⁻¹)*	7,6 ± 0,5
DQO (mg l ⁻¹)*	3121 ± 146
Sólidos Totais (mg l ⁻¹)*	1066 ± 139
Carbono (%)*	0,6 ± 0,1
Nitrogênio (%)*	0,3 ± 0,1

* Os valores correspondem à média e o desvio padrão, para n = 3.

Tabela 3. Resultados da determinação de elementos majoritários e minoritários do subproduto aquoso sem pré-tratamento e após etapas de centrifugação e filtração.

	Amostra "in natura"		Amostra centrifugada e filtrada	
	Concentração ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%)	Concentração ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%)
Ag ^a	0,37 ± 0,03	8,1	0,46 ± 0,10	2,2
Al ^b	228 ± 2	0,7	96,8 ± 5,0	5,2
B ^a	343 ± 16	4,7	340 ± 50	14,6
Ba ^a	27,4 ± 1,7	6,2	19,9 ± 4,2	21,1
Ca ^b	437 ± 9	2,0	402 ± 35	8,8
Cd ^a	< 0,01	-	< 0,01	-
Cl ^b	1039 ± 102	9,8	1142 ± 148	13,0
Co ^a	0,16 ± 0,05	31,2	0,16 ± 0,04	25,0
Cr ^a	< 0,05	-	< 0,05	-
Fe ^b	146 ± 4	2,4	74,4 ± 15,3	20,6
Li ^a	< 0,01	-	< 0,01	-
K ^b	420 ± 13	3,1	441 ± 10	2,4
Mg ^a	236 ± 12	5,2	189 ± 23	12,0
Mn ^a	6,1 ± 1,5	24,6	4,9 ± 1,2	24,5
Na ^b	3257 ± 143	4,4	3020 ± 92	3,0
Ni ^a	2,2 ± 1,5	68,2	2,5 ± 0,2	8,0
P ^b	< 25	-	< 25	-
Pb ^a	1,1 ± 0,1	9,1	0,26 ± 0,10	38,5
S ^b	199322 ± 5780	2,9	189456 ± 7825	4,1
Se ^a	1279 ± 16	1,3	1305 ± 68	5,2
Si ^b	1663 ± 205	12,3	1715 ± 42	2,4
Sr ^a	16,8 ± 1,5	8,9	16,9 ± 0,1	0,6
Ti ^a	< 0,5	-	< 0,5	-
V ^a	2,2 ± 0,3	13,6	2,1 ± 0,3	14,3
Zn ^a	57,4 ± 2,2	3,8	50,4 ± 5,8	11,5

Os valores correspondem à média e o desvio padrão, para n = 3.

^a Determinações feitas por ICP-MS.

^b Determinações feitas por ICP OES.

^c Desvio padrão relativo.

Para a determinação da concentração de arsênio total na amostra, foram utilizadas as técnicas de ICP-MS, ICP OES e GF AAS. Os resultados estão mostrados na Tabela 4. Como pode ser observado, os valores obtidos são da

mesma ordem de grandeza. Os resultados um pouco mais elevados obtidos por ICP-MS e ICP OES para as amostras não decompostas pode ser devido ao efeito do carbono presente na amostra.¹⁷⁰

Tabela 4. Resultados obtidos na determinação de arsênio total por ICP-MS, ICP OES e GF AAS.

Amostras	ICP-MS		ICP OES		GF AAS	
	As (mg l ⁻¹)	RSD (%)*	As (mg l ⁻¹)	RSD (%)*	As (mg l ⁻¹)	RSD (%)*
Decomposta	2,8 ± 0,2	7	2,8 ± 0,2	7	3,0 ± 0,1	3
“ <i>in natura</i> ”	3,0 ± 0,1	3	3,0 ± 0,4	13	2,5 ± 0,1	4
Centrifugada e filtrada	3,1 ± 0,2	6	3,1 ± 0,2	6	2,5 ± 0,1	4

Os valores correspondem à média e o desvio padrão, para n = 3.

*RSD = desvio padrão.

4.2. AJUSTE DO SISTEMA LC-ICP-MS

4.2.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS

Inicialmente, o instrumento de ICP-MS foi ajustado, no modo convencional de introdução de soluções (nebulização pneumática), com a finalidade de obter o máximo de intensidade para íons M⁺ e mínima produção de íons M²⁺ (monitorado pela razão Ba²⁺/Ba⁺ < 3%) e MO⁺ (monitorado pela razão LaO⁺/La⁺ < 3%). Esse ajuste foi feito diariamente utilizando soluções de referência de concentração conhecida (item 3.4. *Ajuste das condições de operação do instrumento de ICP-MS*).

Quando o LC foi acoplado ao instrumento de ICP-MS, a otimização de cada parâmetro foi feita separadamente, onde a vazão da solução a ser introduzida no nebulizador foi fixada em 1,5 ml min⁻¹ e a potência da radiofrequência em 1400 W. Esse valor de potência mais elevado, em relação à potência geralmente usada (~ 1100 W), é aplicado devido ao potencial de ionização relativamente alto do As (9,8 eV) quando comparado ao potencial de ionização de outros elementos (em torno de 70% possuem potencial de ionização inferior a 9 eV¹⁴⁴). A vazão do gás de nebulização foi avaliada de 0,9 a 1,4 ml min⁻¹, e fixada em 1,16 ml min⁻¹, considerando a vazão onde se obteve a maior intensidade do sinal para as espécies

de As. A calibração da lente iônica foi feita com uma solução contendo $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de As. A diferença de potencial aplicado à lente iônica para melhor transmissão do As, onde é obtido máxima intensidade de sinal, é em torno de 7 V.

4.2.2. Escolha da vazão e concentração da fase móvel

A escolha da fase móvel adequada é dependente, principalmente, do tipo de coluna, das espécies a serem separadas e do tipo de detector. Em separações cromatográficas utilizando troca iônica e ICP-MS como detector, vários tipos e composições de fase móvel podem ser usados. O tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) é muito empregado, apesar da grande quantidade de resíduos que são formados (depositados) na interface do instrumento (cone de amostragem, *skimmer* e lente iônica) do instrumento.^{171,172} Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) também é utilizado como fase móvel, porém com menor frequência, mesmo causando baixo ruído instrumental e, relativamente, baixa deposição de resíduos na interface do instrumento.¹⁷¹ Outra fase móvel bastante utilizada é o carbonato de amônio, que além da capacidade de separar eficientemente compostos de arsênio, praticamente não deixa resíduo na interface do equipamento, sendo transformado, no plasma, em dióxido de carbono e água.^{37,173} Por essa razão, o carbonato de amônio foi escolhido como fase móvel.³⁷

Inicialmente, a etapa de eluição foi feita de acordo com o seguinte programa: primeira etapa corresponde a 7 min de eluição com a fase móvel A ($0,015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) e a segunda etapa corresponde a 23 min com a fase móvel B ($0,05 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), em pH 8,5, condição esta, muito semelhante à utilizada por B'Hymer e Caruso.³⁷ Na Fig. 7, pode-se observar que não ocorre uma boa separação entre as três primeiras espécies, possivelmente devido ao tamanho de coluna utilizada pelos autores (Hamilton PRP-X100, 150 x 4,1 mm d.i.) ser diferente da utilizada neste trabalho (Dionex IonPac[®] AS14 250 x 4,1 mm d.i.), apesar da fase estacionária de ambas as colunas ser do mesmo material ($-\text{NR}_3^+$).

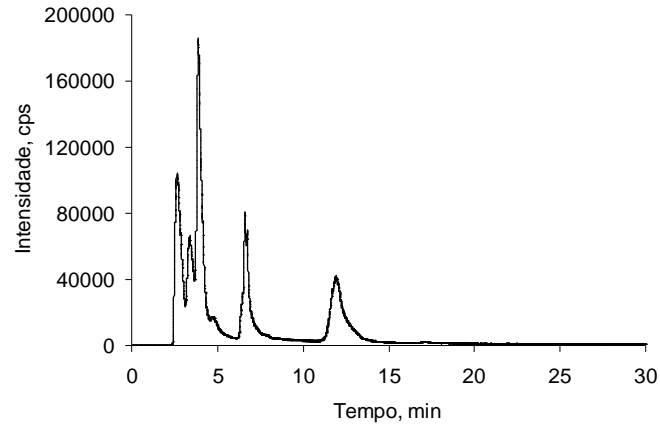


Figura 7. Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo As(III), As(V), DMA, *p*-ASA e AsB, na concentração de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de cada espécie, com injeção de $200 \mu\text{l}$. Eluição isocrática a pH 8,5 e vazão da fase móvel de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 23 min a $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

De acordo com a Fig. 7, pode-se observar que, possivelmente, há maior interação das espécies se As com a fase móvel do que com a fase estacionária, onde a separação das espécies é prejudicada devido à alta concentração da fase móvel. Em vista disso, fez-se uma avaliação das concentrações de ambas as fases móveis, bem como a vazão da fase móvel.

A vazão da fase móvel foi variada de $0,6$ a $1,6 \text{ ml min}^{-1}$. Ao mesmo tempo, foram feitos estudos diminuindo gradativamente a concentração da fase móvel, mas sempre mantendo a proporção e o tempo utilizados nas duas etapas do programa de eluição, conforme as condições citadas anteriormente. Foram avaliadas as seguintes concentrações da fase móvel na primeira e na segunda etapa da eluição: $0,012$ e $0,04 \text{ mol l}^{-1}$; $0,009$ e $0,03 \text{ mol l}^{-1}$; $0,006$ e $0,02 \text{ mol l}^{-1}$; $0,003$ e $0,01 \text{ mol l}^{-1}$; $0,0015$ e $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, respectivamente.

Conforme demonstrado na Fig. 8, a utilização de vazões mais elevadas faz com que se tenha uma melhor resolução entre as espécies e um menor tempo de eluição. Da mesma forma, Milstein *et al.*¹⁷¹ escolheram a vazão de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, após ser feita a variação de $1,0$ a $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Por essa razão, fixou-se a vazão em $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ para estudos posteriores, porém, este parâmetro foi ajustado mais detalhadamente conforme descrito no item 4.2.5. *Ajuste da vazão da fase móvel.*

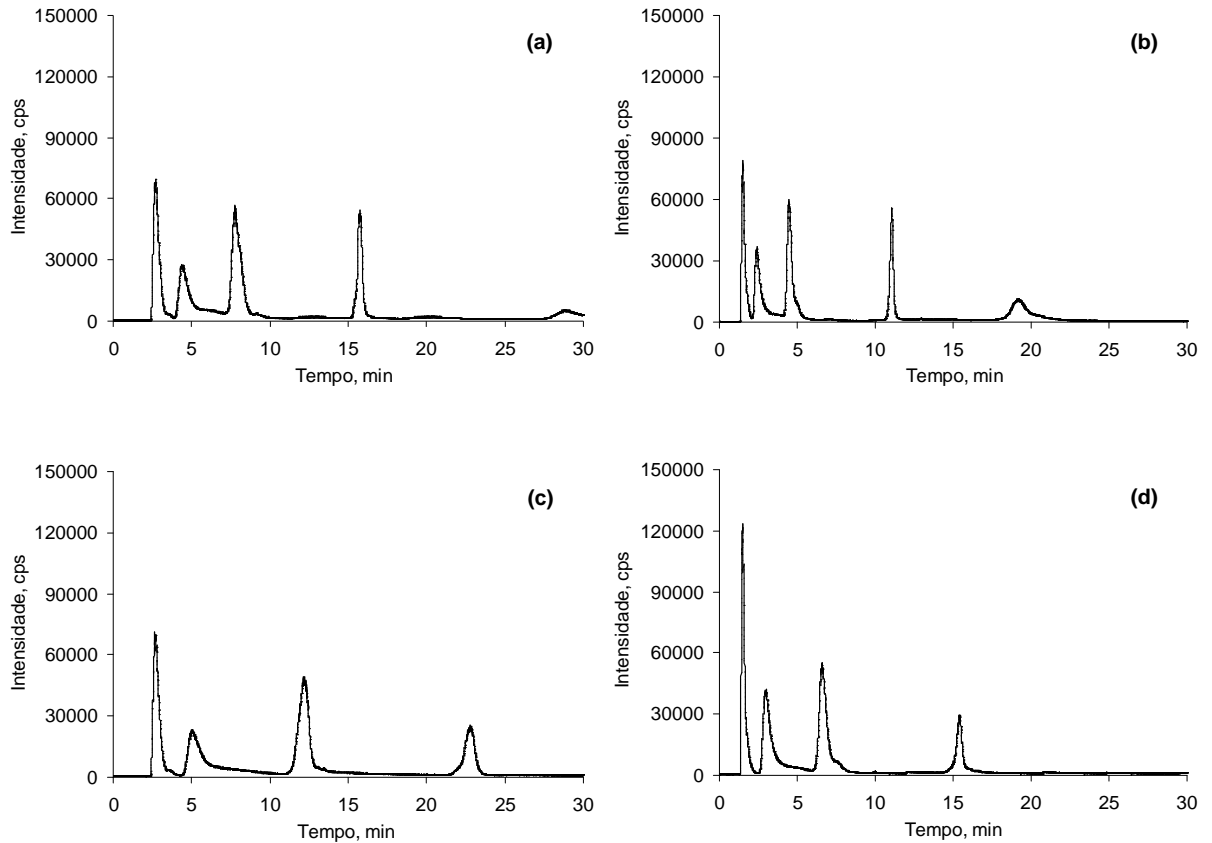


Figura 8. Influência da concentração e vazão da fase móvel na separação das espécies de As. (a) vazão de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ e (b) vazão de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista contendo $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) das espécies AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V) e eluição isocrática em pH 8,5. Programa de eluição: 7 min a $0,003 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 23 min a $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; (c) vazão de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ e (d) vazão de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ com programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 23 min a $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Comparando-se as Fig. 7 e Fig. 8, pode-se perceber que o modo de eluição isocrático com mais de uma etapa (utilização de diferentes concentrações em cada etapa) é o mais adequado quando comparado ao modo de eluição isocrático com uma única etapa (concentração constante durante toda eluição). Se for utilizada uma concentração igual ou inferior a $0,003 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ durante os 30 min da etapa de eluição (concentração constante), as três primeiras espécies são eluídas com uma boa resolução, porém, as duas espécies restantes serão eluídas em um período relativamente longo. Por outro lado, se for utilizada uma concentração superior a $0,003 \text{ mol l}^{-1}$ (concentração constante) durante os 30 min da etapa de eluição, as três primeiras espécies não são separadas adequadamente. Este fato

comprova a necessidade da utilização da eluição isocrática com mais de uma etapa, que além de proporcionar boa resolução, diminui os tempos de retenção.²²

Após serem feitos os estudos relativos à concentração e vazão da fase móvel, foi fixado o valor de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ para a vazão da fase móvel, conforme Fig. 8 (b) e (d). Também foi estabelecido que na primeira etapa (7 min iniciais) a concentração mais adequada foi de $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ e para a segunda etapa (23 min finais) a concentração foi fixada em $0,02 \text{ mol l}^{-1}$. Assim, os estudos subseqüentes foram feitos com as condições semelhantes às utilizadas na Fig. 8 (b).

4.2.3. Identificação das espécies de arsênio

Após a otimização prévia das condições de vazão e concentração da fase móvel, houve a necessidade da identificação e determinação do tempo de retenção de cada espécie para os estudos posteriores. Para isso, foi injetada uma solução de referência contendo As(III), As(V), DMA, *p*-ASA e AsB na concentração de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de cada espécie, e em seguida foram injetadas soluções de referência contendo $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de As de cada espécie separadamente, como demonstrado na Fig. 9. A partir destes dados, foi possível estabelecer a ordem de eluição das espécies em função do tempo de retenção. A ordem de eluição (em minutos, $n = 3$) com seu respectivo desvio padrão foi a seguinte: AsB $1,51 \pm 0,01$; As(III) $3,01 \pm 0,06$; DMA $7,57 \pm 0,01$; *p*-ASA $12,05 \pm 0,02$; As(V) $13,38 \pm 0,03$ min. Com a adequação das condições de separação, após a injeção da solução mista de As (Fig. 9 (a)), percebe-se que o tempo necessário para a eluição de todas as espécies pode ser reduzido para até 15 min.

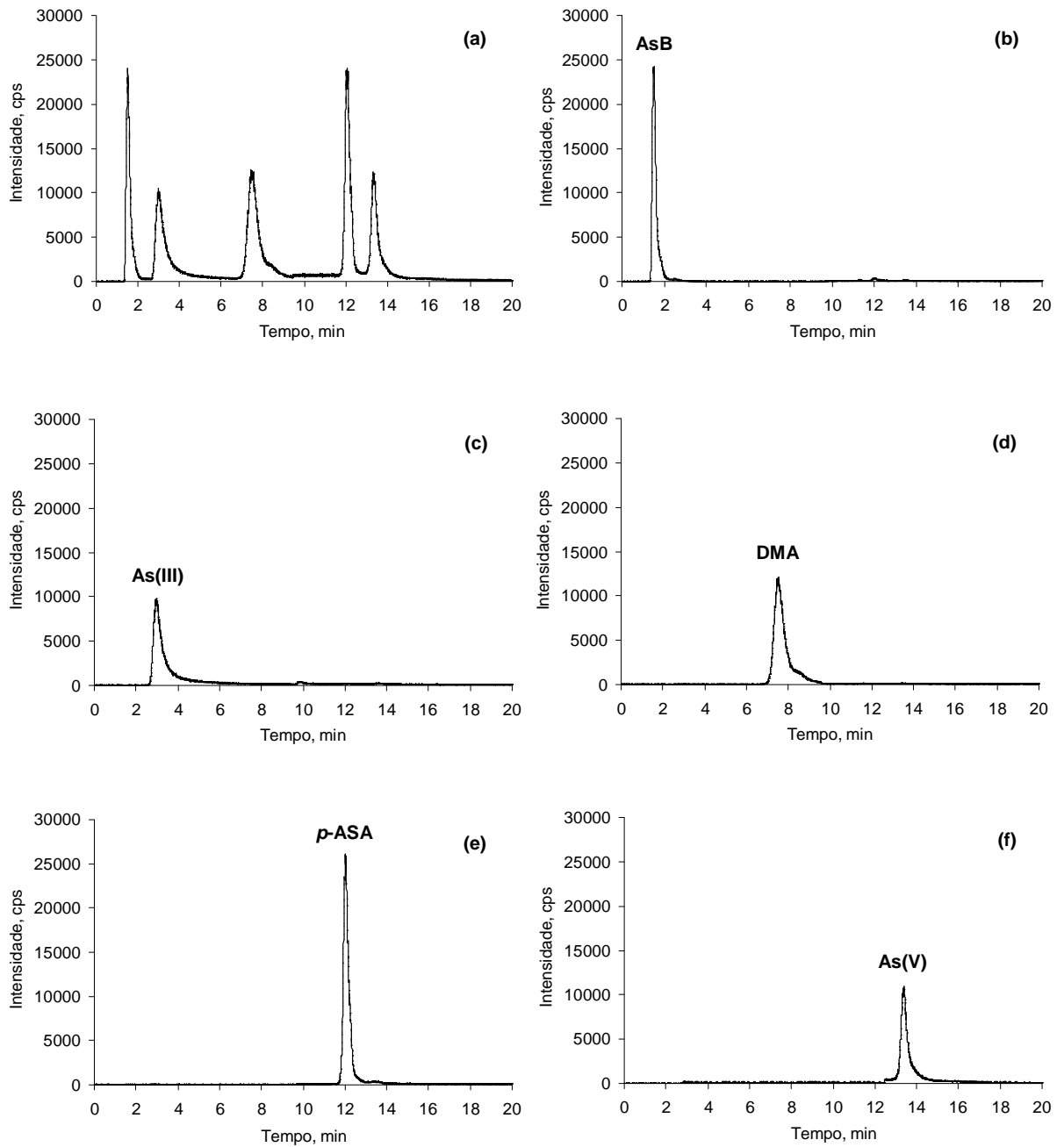


Figura 9. Cromatogramas obtidos a partir de (a) uma solução mista de As(III), As(V), DMA, *p*-ASA e AsB, com concentração de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de cada espécie; (b) solução de referência de AsB; (c) solução de referência de As(III); (d) solução de referência de DMA; (e) solução de referência de *p*-ASA; (f) solução de referência de As(V). Eluição isocrática em pH 8,5 e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de cada solução.

4.2.4. Influência do pH da fase móvel

A escolha das características do sistema de separação em cromatografia de íons baseia-se nas características físico-químicas, como propriedades ácido-base (valores de pK_a), polaridade e solubilidade das espécies a serem separadas.¹⁷³ Para a análise de especiação de arsênio, o pH é um dos principais parâmetros que exerce influência na separação das espécies. Quando $(NH_4)_2CO_3$ é utilizado como fase móvel, a faixa de pH comumente utilizada é entre 8 e 10.^{37,171,173} Em vista disso, o pH da fase móvel foi variado de 7 a 10, cujo efeito na separação das espécies de arsênio é mostrado na Fig. 10.

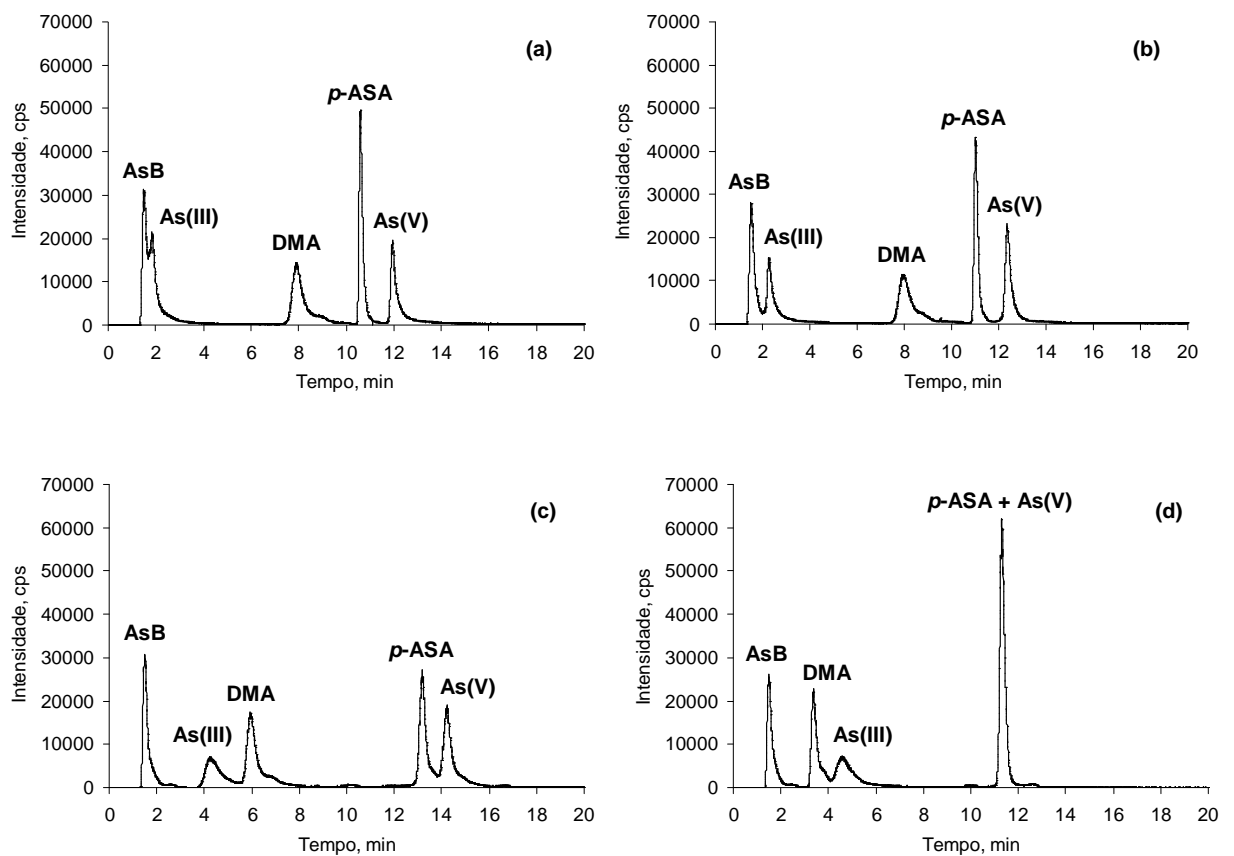


Figura 10. Efeito do pH da fase móvel na separação das espécies. (a) pH 7; (b) pH 8; (c) pH 9; (d) pH 10. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(NH_4)_2CO_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(NH_4)_2CO_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V).

Com a fase móvel em pH 7 (Fig. 10 (a)), ocorre a protonação do As(III), formando ácido arsenoso (pK_{a1} 9,23). Uma vez protonado, sua interação com a coluna é reduzida, sendo eluído praticamente no mesmo tempo que a AsB. A AsB é uma espécie neutra, e é eluída sem qualquer interação com a fase estacionária, fato

este, que dificulta a separação entre as espécies de As(III) e AsB neste pH. O mesmo efeito foi observado por Lintschinger *et al.*¹⁵³ Desta forma, utilizaram hidróxido de tetrametilamônio no início da eluição para promover a desprotonação do ácido arsenoso.

Com o aumento do pH (Fig. 10 (b), (c) e (d)), a dissociação do ácido arsenoso é favorecida, que interage mais fortemente com a fase estacionária em relação ao ácido dimetilarsônico (pK_{a1} 1,3 e pK_{a2} 6,2). Um efeito semelhante ao citado anteriormente ocorre com as espécies de ácido *p*-arsanílico e ácido arsênico. Com o aumento de pH, aumenta também a dissociação do ácido arsênico (pK_{a1} 2,2; pK_{a2} 6,9 e pK_{a3} 11,5), conseqüentemente, interagindo mais fortemente com a coluna.^{153,173}

Após a averiguação dos resultados com relação ao pH da solução que propicia melhor separação das espécies de arsênio, optou-se por valores de pH entre 8 e 9. Porém, em razão da diferença nos tempos de retenção, quando comparados os dois valores de pH, houve a necessidade de um ajuste mais detalhado. Assim, o efeito do pH da fase móvel foi avaliado utilizando valores de 8,2; 8,4; 8,6 e 8,8. Na Fig. 11 estão apresentados os valores de pH que proporcionaram uma melhor separação entre as espécies. Foi escolhido o pH 8,7 em função de proporcionar uma boa resolução, principalmente entre a AsB, As(III) e DMA, e um tempo não muito longo para a eluição de todos os compostos.

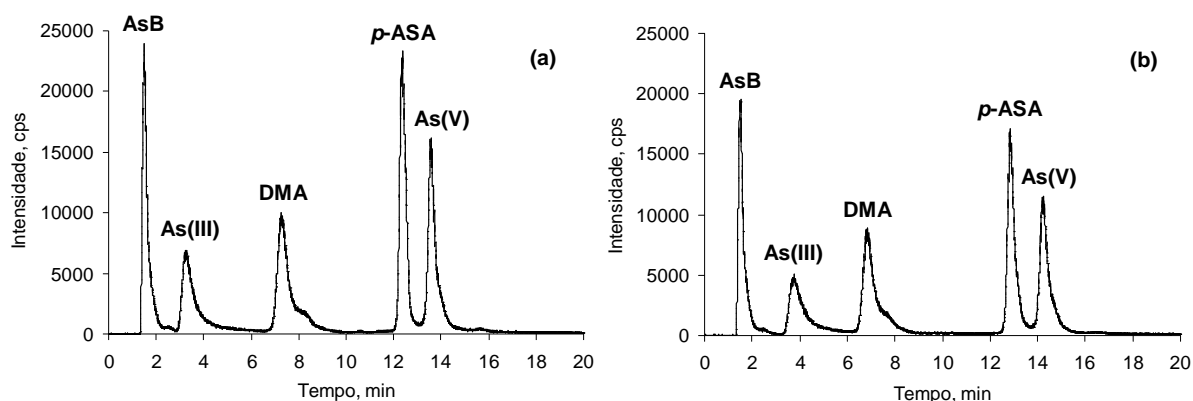


Figura 11. Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de arsênio. (a) pH 8,6 e (b) pH 8,8. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 13 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V).

4.2.5. Ajuste da vazão da fase móvel

Diferentes vazões de fase móvel, de 0,8 até 1,6 ml min⁻¹, são normalmente empregadas em LC.^{37,171} Sendo assim, após terem sido feitos os ajustes dos parâmetros que mais influenciam na separação, foi otimizada a vazão da fase móvel, de maneira que se obtenha um cromatograma com uma boa resolução entre as espécies de arsênio e com o menor tempo. A vazão foi variada de 0,8 a 1,6 ml min⁻¹, utilizando condições pré-estabelecidas. Na Fig. 12 estão demonstrados alguns dos resultados obtidos com as diferentes vazões e os efeitos causados na separação das espécies.

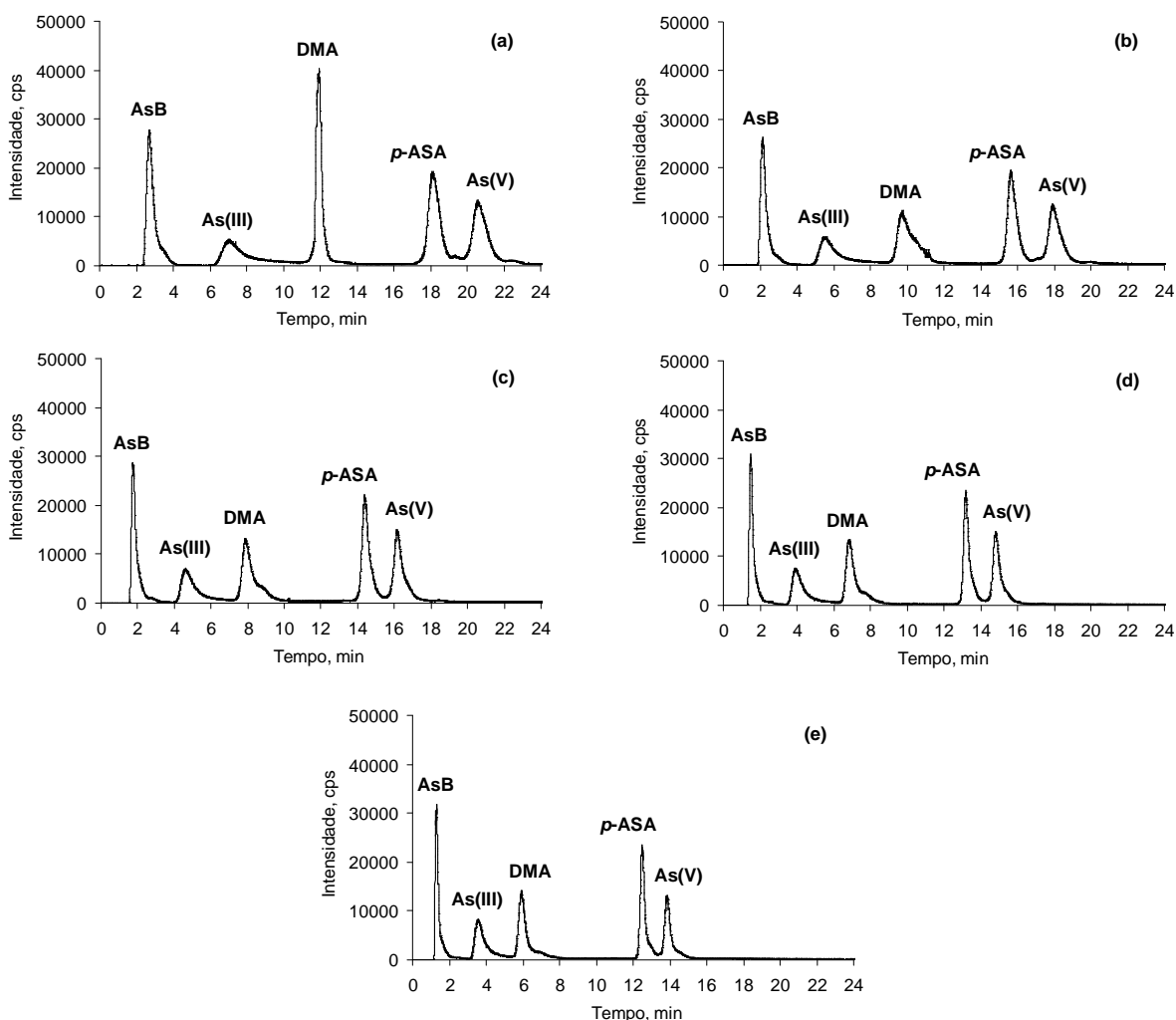


Figura 12. Efeito da vazão da fase móvel na separação das espécies de arsênio. (a) 0,8 ml min⁻¹; (b) 1,0 ml min⁻¹; (c) 1,2 ml min⁻¹; (d) 1,4 ml min⁻¹; (e) 1,6 ml min⁻¹. Eluição isocrática em pH 8,7 com o programa: 7 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 18 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, p-ASA e As(V).

Foi selecionada a vazão de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ por levar à menores tempos de retenção das espécies de arsênio (30% em média, em relação à vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$), além de apresentar sinais com melhor perfil (picos menos alargados).

Uma vez que a otimização da metodologia foi feita empregando soluções de referência, houve a necessidade de verificar o comportamento das espécies de As presente amostra perante estas condições. Para tal, a amostra foi injetada no cromatógrafo sem diluição e após ter sofrido o tratamento preliminar conforme descrito no item 3.6.1. *Tratamento preliminar da amostra*. Na Fig. 13 está o cromatograma da amostra de subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.

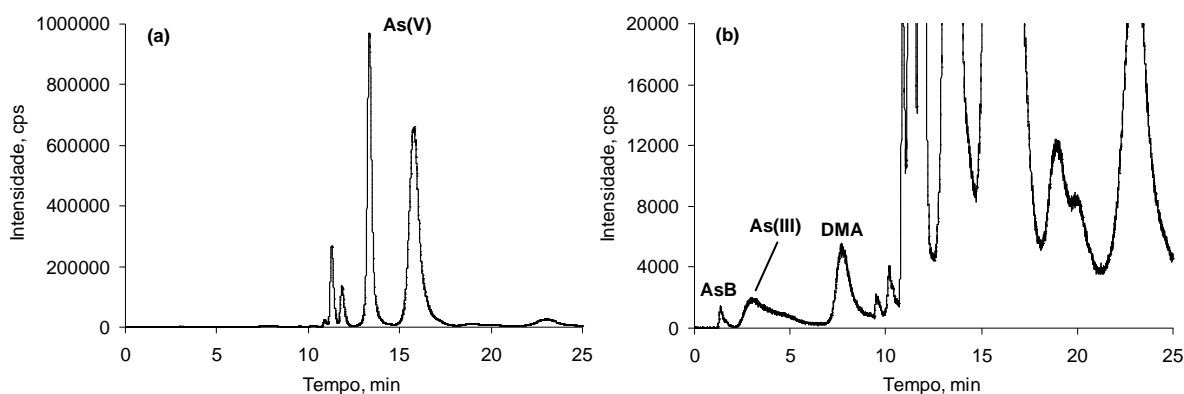


Figura 13. Cromatograma obtido a partir da amostra de subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso nas condições previamente otimizadas. (a) amostra centrifugada, filtrada e sem diluição; (b) cromatograma (a) ampliado 50 vezes. Eluição isocrática e vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$: 7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 18 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, ambos em pH 8,7. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de amostra.

A partir da Fig. 13, é possível perceber que há uma grande quantidade de espécies de arsênio na amostra, e devido à sobreposição de sinais foi necessário fazer um novo ajuste das condições para uma melhor separação das espécies de arsênio. Para tal, um programa de eluição em que a concentração da fase móvel aumente de forma gradual e mais lentamente, quando comparado ao programa pré-estabelecido (7 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 18 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), foi avaliado. Conforme pode ser observado na Fig. 13 (b) (ampliação de 50 vezes), é possível notar que, em função das várias espécies de As presentes na amostra, principalmente entre o intervalo de 10 a 20 min, a resolução entre as

espécies foi prejudicada, havendo a necessidade de uma modificação no programa de eluição.

4.2.6. Ajuste da concentração da fase móvel

A concentração da fase móvel é um parâmetro muito importante, principalmente nos casos em que várias espécies com características semelhantes de um mesmo elemento estão presentes na amostra.¹⁵³ Em vista da dificuldade de separação entre as espécies de arsênio na amostra em estudo, o programa de eluição foi modificado. Conforme mencionado, o programa pré-estabelecido consistia de duas etapas, sendo que na primeira a eluição era feita com 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ durante os 7 min iniciais e, nos 18 min restantes, a concentração era elevada para 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Nesse programa o aumento brusco na concentração da fase móvel de 0,0015 mol l⁻¹ para 0,02 mol l⁻¹, faz com que aumente a interação das espécies de arsênio com a fase móvel, influenciando diretamente na separação das espécies presentes na amostra (período entre 10 e 20 min de eluição). O mesmo efeito devido ao aumento da concentração da fase móvel também foi observado para as soluções de referência, para a separação entre *p*-ASA e As(V), conforme pode ser observado na Fig. 14.

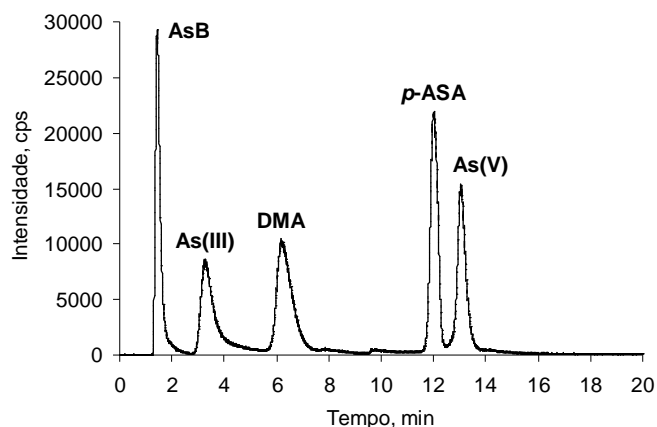


Figura 14. Cromatograma obtido quando a eluição é feita em duas etapas. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 7 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 13 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução de referência mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V).

Sendo assim, foi avaliado um programa de eluição constituído por três etapas de 10 min cada, a fim de melhorar a resolução a partir dos 10 min iniciais de eluição. Na primeira etapa foi apenas alterado o tempo (10 min), sendo que a concentração da fase móvel continuou sendo de $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Na segunda etapa também foi utilizado o tempo de 10 min, avaliando-se as concentrações de 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125 e 0,015 mol l^{-1} , conforme demonstrado na Fig. 15 (estão demonstradas apenas três das cinco concentrações testadas). Na terceira etapa a concentração foi mantida constante em $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ durante os 10 min finais.

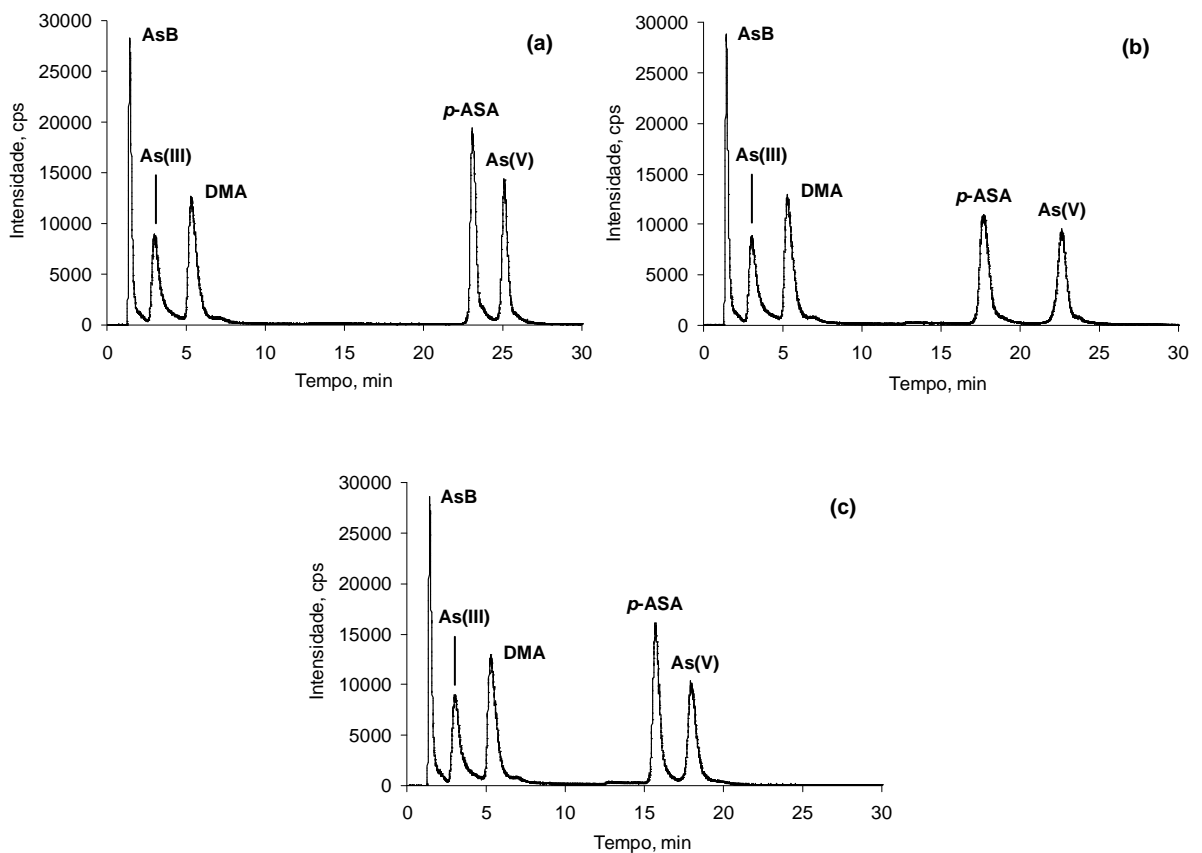


Figura 15. Efeito da concentração da fase móvel na segunda etapa da eluição sobre a separação das espécies de arsênio. Sendo (a) $0,005 \text{ mol l}^{-1}$; (b) $0,01 \text{ mol l}^{-1}$; (c) $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ a concentração da fase móvel na segunda etapa da eluição. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 10 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 10 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Injeção de $200 \mu\text{l}$ de solução de referência mista com $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V).

Conforme a Fig. 15 (a), percebe-se que utilizando $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ na segunda etapa, as espécies *p*-ASA e As(V) tem um elevado tempo de retenção, decorrente da sua forte interação com a fase estacionária e baixa concentração da fase móvel. Utilizando a concentração em torno de $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ na segunda etapa, nota-se que há uma boa separação entre o *p*-ASA e o As(V). Desta forma, a amostra foi novamente injetada no cromatógrafo (Fig. 16 (a) e (b)), com a finalidade de avaliar seu comportamento perante essas condições.

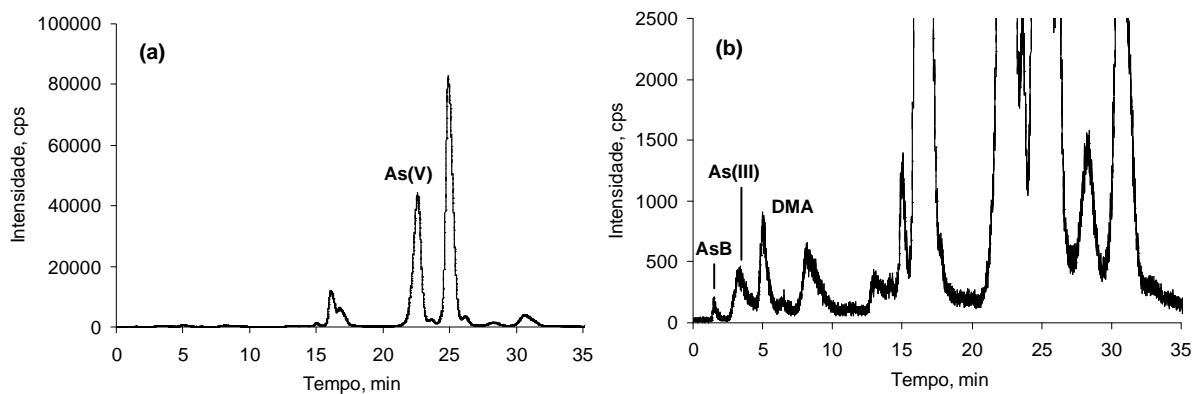


Figura 16. Cromatograma obtido a partir do subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso. Injeção de $200 \mu\text{l}$ da amostra diluída 10 vezes, onde (a) corresponde à amostra centrifugada e filtrada e diluída em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$; (b) cromatograma (a) ampliado 40 vezes. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Programa de eluição: 10 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 10 min a $0,012 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 10 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Ao comparar a análise da amostra sem diluição e, também, com diluição (em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$) de 10 vezes, percebeu-se que as espécies presentes nos cromatogramas obtidos sem e com diluição, não apresentavam diferença no número de espécies. Apesar da diminuição na intensidade dos sinais para as amostras diluídas, ainda foi possível fazer a quantificação.

Na Tabela 5 está mostrado o programa de eluição após ajustados todos os parâmetros cromatográficos.

Tabela 5. Características gerais do programa de eluição após otimização das condições. Vazão da fase móvel ((NH₄)₂CO₃) de 1,5 ml min⁻¹ e em pH 8,7.

	Tempo (min)	Concentração (mol l ⁻¹)
Etapa 1	10	0,0015
Etapa 2	10	0,012
Etapa 3	10	0,02

4.2.7. Condicionamento da coluna cromatográfica

Foi verificando que para uma boa reprodutibilidade nos tempos de retenção entre as eluições, é necessário que seja adotada uma etapa de condicionamento da coluna para que o sistema se torne estável para a próxima análise. Esse procedimento é feito, principalmente, se a fase móvel utilizada no início da eluição possuir concentração inferior à concentração da fase móvel no final da eluição anterior.¹⁶⁶ Como esse é o modo de eluição utilizado, foram estudados tempos de condicionamento da coluna entre 0 e 15 min, conforme mostrado na Fig. 17.

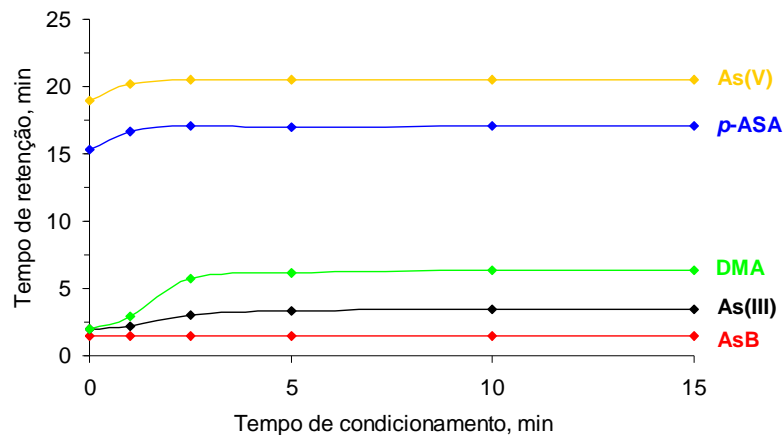


Figura 17. Influência do tempo de condicionamento da coluna sobre o tempo de retenção das espécies. Eluição isocrática em pH 8,7 e vazão da fase móvel de 1,5 ml min⁻¹. Programa de eluição: 10 min a 0,0015 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃, 10 min a 0,012 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 10 min a 0,02 mol l⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. Injeção de 200 µl de solução de referência mista com 10 µg l⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, p-ASA e As(V).

Conforme mostrado na Fig. 17, fica evidenciada a necessidade de uma etapa de condicionamento da coluna entre as eluições. A alteração nos tempos de

retenção é mais visível quando se utilizam curtos intervalos de tempo de condicionamento da coluna (até 5 min). Este fato pode ser explicado, possivelmente, em função de que a fase móvel da eluição anterior não tenha saído completamente da coluna em períodos de tempo mais curtos. O tempo inadequado de condicionamento pode acarretar em dificuldades na separação das espécies de arsênio e reprodutibilidade dos tempos de retenção, principalmente entre as espécies AsB, As(III) e DMA.

4.2.8. Estudo de interferências espectrais na determinação de arsênio por ICP-MS

A determinação de arsênio por ICP-MS, assim como outros elementos, pode ser prejudicada por interferências causadas por íons poliatômicos. Esse tipo de interferência pode ocorrer em função da matriz da amostra, de reagentes utilizados no preparo da amostra ou de espécies geradas no plasma por combinação com os gases atmosféricos.^{144,146,174} Dentre os interferentes (por exemplo, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2^+$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$), no caso da determinação de arsênio, o cloreto é um dos mais severos, devido à formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ (m/z 75).¹⁶⁹

Desta forma, foi estudada a possível interferência do cloreto durante a determinação das espécies de arsênio, avaliando concentrações entre 10 mg l^{-1} e 5000 mg l^{-1} de Cl^- , como mostrado na Fig. 18.

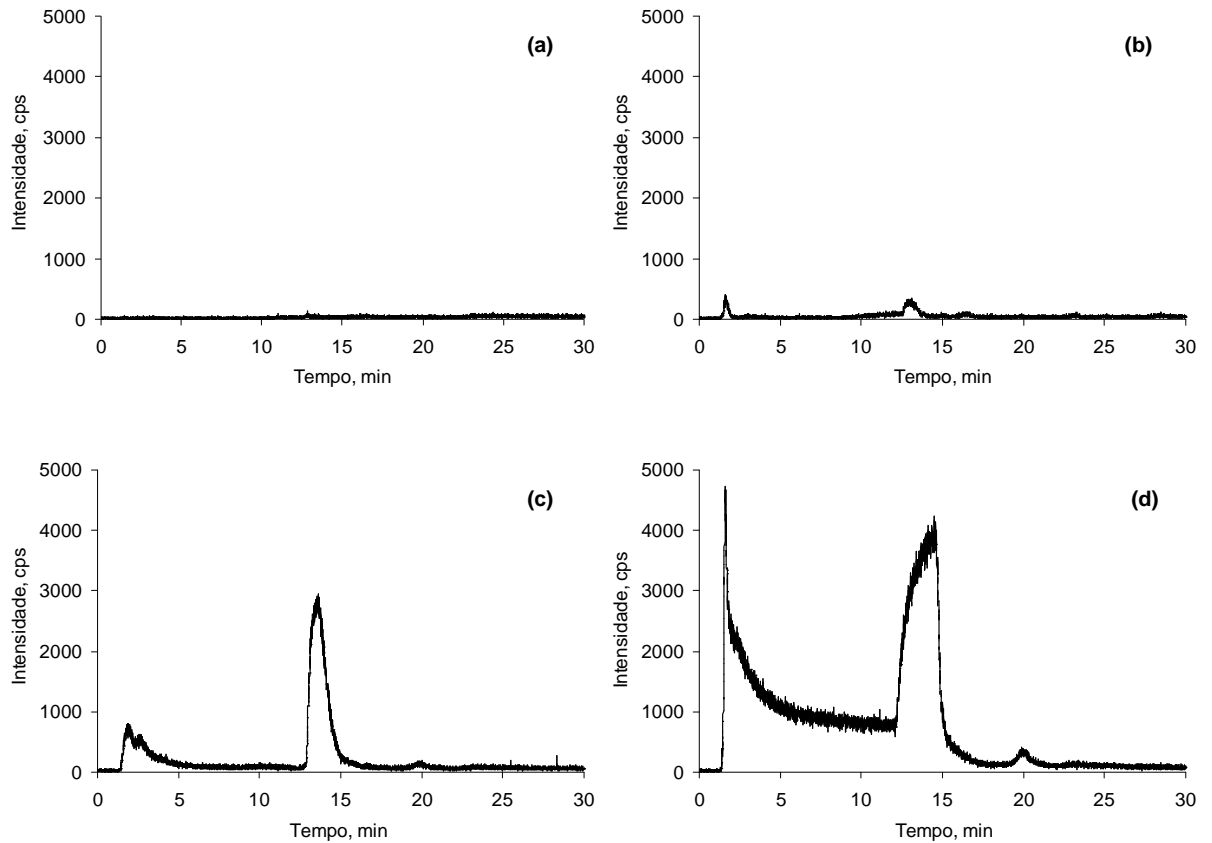


Figura 18. Influência do Cl^- ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, m/z 75) na determinação de arsênio ($^{75}\text{As}^+$) por LC-ICP-MS. Injeção de solução com (a) 10 mg l^{-1} , (b) 100 mg l^{-1} , (c) 1000 mg l^{-1} e (d) 5000 mg l^{-1} de Cl^- . Eluição isocrática com vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, em pH 8,7. Programa de eluição: 10 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 10 min a $0,012 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 10 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

De acordo com a Fig. 18 é possível observar que concentrações acima de 10 mg l^{-1} de Cl^- podem influenciar na determinação de arsênio por ICP-MS. Sendo assim, o fato da concentração desse interferente ser em torno de 1 mg l^{-1} (Tabela 3) na amostra, a possibilidade de ocorrer interferência por essa espécie nas determinações de arsênio por LC-ICP-MS é desprezível.

4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM SUBPRODUTO AQUOSO DO PROCESSO DE PIRÓLISE DO FOLHELHO BETUMINOSO

O processo de tratamento da amostra (basicamente centrifugação e filtração) citado anteriormente (item 3.6.1. *Tratamento preliminar da amostra*), torna-se

importante em função da grande quantidade de sólidos presentes que, se injetados no cromatógrafo, podem causar obstrução da coluna. Da mesma forma, a diluição da amostra pode diminuir o efeito de memória causado pela alta concentração de algumas espécies de arsênio.

Para a validação da metodologia, foram adicionadas soluções de referência à amostra diluída 10 vezes (em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$), nas concentrações de $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ de AsB, $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III), $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de DMA, $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de *p*-ASA e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(V). Conforme mostrado na Tabela 6, a recuperação das espécies foi quantitativa, demonstrando a boa exatidão do método.

Tabela 6. Resultados obtidos para as espécies de arsênio no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, diluída 10 vezes em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$.

Espécie	Concentração de As ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recuperação (%)
AsB	-	93
As(III)	$0,45 \pm 0,01$	96
DMA	$0,69 \pm 0,04$	103
<i>p</i> -ASA	-	107
As(V)	$80,8 \pm 2,2$	98

Os valores correspondem à média e desvio padrão, para $n=3$.

Os resultados obtidos para a concentração total das espécies identificadas na amostras foram de $4,5$; $6,9$ e $808 \mu\text{g l}^{-1}$ para As(III), DMA e As(V), respectivamente. Cabe salientar, que o ácido *p*-arsanílico não pôde ser detectado na amostra por estar abaixo do limite de detecção (Tabela 8) do método. Porém o sinal pode ser identificado quando esta espécie é adicionada à amostra.

Conforme mostrado na Fig. 19, outras espécies de As podem estar presentes neste tipo de amostra, como por exemplo, os ácidos fenilarsônico e monometilarsênico.¹⁷⁴ Da mesma forma, devido a alta concentração de enxofre na amostra podem ser formadas diversas espécies de As ligadas ao enxofre.^{175,176}

O primeiro pico que aparece nos cromatogramas das Fig. 13, 16 e 19, pode não ser correspondente à espécie AsB, pelo fato desta espécie ser encontrada, normalmente, em amostras biológicas como organismos marinhos e não em amostras como a investigada neste trabalho.¹⁷⁰ Algumas espécies de As, como AsC e TMA, podem apresentar comportamento semelhante ao da AsB nas condições

utilizadas, por serem neutras ou positivamente carregadas, não tendo qualquer interação como fase estacionária.¹⁷⁷

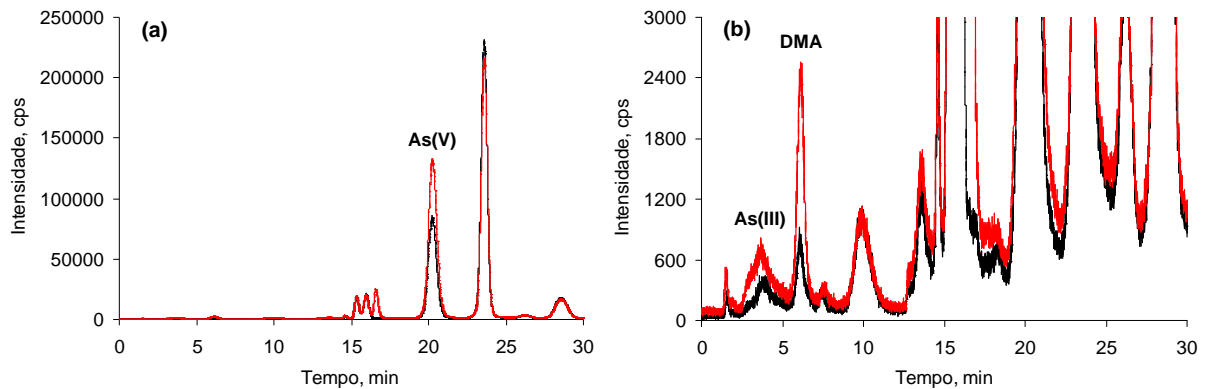


Figura 19. Cromatograma obtido a partir da amostra diluída 10 vezes em $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (a) e (b) cromatograma (a) ampliado 80 vezes. Cromatograma em preto é referente à amostra diluída 10 vezes, enquanto que o cromatograma em vermelho corresponde a amostra diluída 10 vezes com adição de $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de AsB, $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de As(III), $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de DMA, $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de *p*-ASA e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (como As) de As(V). Eluição isocrática com vazão da fase móvel de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, em pH 8,7. Programa de eluição: 10 min a $0,0015 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 10 min a $0,012 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 10 min a $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

De acordo com a Fig. 19 pode-se observar um grande número de espécies de arsênio presentes na amostra, porém, em função da indisponibilidade de soluções de referência para todas as espécies presentes na amostra, somente as espécies As(III), DMA e As(V) foram quantificadas. Além de As(III), DMA e As(V), foram identificados os tempos de retenção das espécies de As referentes às espécies não identificadas. Os tempos de retenção das espécies de arsênio contidas na amostra estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de retenção das espécies de arsênio presentes no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso.

Espécies de As	t_r^{***}
*	1,58 ± 0,04
As(III)	3,70 ± 0,18
DMA	6,09 ± 0,06
**	7,39 ± 0,03
**	10,08 ± 0,09
**	13,68 ± 0,05
**	14,72 ± 0,07
**	15,51 ± 0,04
**	16,15 ± 0,04
As(V)	20,30 ± 0,12
**	23,69 ± 0,06
**	26,36 ± 0,03
**	28,77 ± 0,11

* espécie(s) de As co-eluídas com a AsB.

** espécies não identificadas.

*** tempo de retenção (min), para n = 5.

Os limites de detecção do método, para as espécies estudadas são mostrados na Tabela 8. Estes valores foram estimados pela multiplicação por 3 do valor do desvio padrão de 10 medidas do branco. Foi utilizado $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0,0015 mol l⁻¹ como branco.

Tabela 8. Limites de detecção e tempos de retenção obtidos para as diferentes espécies de As.

	LD, ng l ⁻¹ ^a	t_r , min ^b	Equação da curva de calibração ^c	R ² ^d
AsB	5	1,51 ± 0,02	y = 34179x + 803	0,9999
As(III)	4	3,28 ± 0,05	y = 33963x + 3025	0,9998
DMA	19	6,52 ± 0,04	y = 38976x + 3706	0,9998
p-ASA	11	16,78 ± 0,03	y = 39740x + 3079	0,9998
As(V)	57	20,31 ± 0,10	y = 36589x + 2204	0,9996

^a limite de detecção.

^b tempo de retenção, para n = 5.

^c y = contagens e x = µg l⁻¹.

^d coeficiente de correlação das curvas de calibração.

Pode-se verificar que, embora a amostra utilizada tenha sido diluída 10 vezes, as concentrações das espécies de As determinadas foram superiores aos limites de detecção do método. Na mesma Tabela 8, também estão relacionados os tempos de retenção e os parâmetros das curvas de calibração. Com base nos cromatogramas obtidos, é possível separar, nesta amostra, até 13 espécies de arsênio em um período de 30 minutos de eluição.

Cabe ressaltar que bons coeficientes de correlação das curvas de calibração foram obtidos para todas as espécies de arsênio, com valores superiores a 0,999, o que sugere que a faixa linear possa ser estendida. Além disso, foi observada uma boa reprodutibilidade entre os tempos de retenção.

Estudo semelhante foi feito por Fish *et al.*¹⁷⁴ para especiação de arsênio em água de retortagem do processamento do xisto. Os autores utilizaram uma coluna de troca aniônica para a separação (com carbonato de amônio como fase móvel) e a técnica de GF AAS para a detecção. Da mesma maneira que no presente trabalho, as amostras foram filtradas através de filtro com 45 µm de tamanho de poro e armazenadas a 4 °C. Embora não possa ser feita uma comparação entre as concentrações determinadas das espécies em função da diferente formação geológica da amostra, entretanto, os parâmetros de mérito podem ser comparados. Assim, pode-se destacar que os limites de detecção obtidos para todas as espécies foram em torno de 100 vezes melhores do que aqueles obtidos no trabalho de Fish *et al.*¹⁷⁴

5. CONCLUSÕES

.De um modo geral, o método desenvolvido neste trabalho para o sistema LC-ICP-MS foi adequado para a separação de até treze espécies de arsênio, sendo que três delas (As(III), DMA e As(V)) puderam ser identificadas e quantificadas, possibilitando assim, a análise de especiação de As no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, cuja matriz é bastante complexa.

O procedimento para o preparo da amostra é simples e rápido, pois envolve apenas a centrifugação e filtração. O tempo necessário para a separação das espécies na solução de referência mista foi em torno de 15 min. Entretanto, quando foi feita a separação das espécies de As na amostra, o tempo necessário foi de 30 minutos, devido a grande quantidade de espécies de As presentes na amostra.

Com o ajuste dos principais parâmetros que influenciam na separação das espécies por LC, além de ser possível identificar e quantificar três espécies na amostra analisada, os LD são da ordem de 5, 4, 11, 19 e 57 ng l⁻¹ (como As) para as espécies de AsB, As(III), DMA, *p*-ASA e As(V), respectivamente. A sensibilidade do método é elevada, o que poderia permitir a determinação das cinco espécies de arsênio investigadas em concentrações da ordem de ng l⁻¹, com boa precisão (RSD < 6%) e exatidão (avaliada através de testes de recuperação do analito).

Entretanto, é importante destacar que não foi possível quantificar a espécie *p*-ASA, por esta espécie estar abaixo do LD. Sob este aspecto, cabe salientar que os resultados foram satisfatórios, também, quando comparado com outros métodos de separação e detecção citados na literatura.¹⁷⁴

O acoplamento entre as técnicas de LC e ICP-MS é simples, não necessitando modificar os equipamentos convencionais, além de apresentar uma boa reprodutibilidade entre as medições. Uma outra vantagem, quando comparado com outros sistemas usados para análise de especiação,¹⁷⁴ é que com o sistema LC-ICP-MS, todo o processo de separação e quantificação das espécies é feito em linha (*on line*).

Apesar de não existir materiais de referência certificados com composição semelhante ao subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, a validação foi feita através da recuperação de analito, sendo as recuperações de cada espécie de As foram entre 93 e 107%.

Sendo assim, foi possível detectar quantitativamente As(III), DMA e As(V) no subproduto aquoso do processo de pirólise do folhelho betuminoso, apresentando baixos limites de detecção (na ordem de ng l^{-1}), boa linearidade e satisfatórios índices de recuperação dos analitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kot, A., Namiesnik, J., The role of speciation in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 69-79.
2. Gong, Z., Lu, X., Ma, M., Watt, C., Le, X. C., Arsenic speciation analysis, *Talanta* 58 (2002) 77-96.
3. Mandal, B. K., Suzuki, K. T., Arsenic round the world: a review, *Talanta* 58 (2002) 201-235.
4. Spuznar, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst* 125 (2000) 963-988.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds*. 2nd ed. Genebra, Suíça, 2001, 501 p.
6. Leermakers, M., Baeyens, W., De Gieter, M., Smedts, B., Meert, C., De Bisschop, H. C., Morabito, R., Quevauviller, Ph., Toxic arsenic compounds in environmental samples: speciation and validation, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1-10.
7. Davidson, C. I., Goold, W. D., Mathison, T. P., Wiersma, G. B., Brown, K. W., Reilly, M. T., Airborne trace-elements in great smoky mountains, olympic, and glacier national-parks, *Environ. Sci. Technol.* 19 (1985) 27-35.
8. Anderson, R. K., Thompson, M., Culbard, E., Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. I. Reaction media, *Analyst* 111 (1986) 1143-1152.
9. Burguera, M., Burguera, J. L., Brunetto, M. R., De La Guardia, M., Salvador, A., Flow-injection atomic spectrometric determination of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) species by use of an aluminium-column arsine generator and cold-trapping arsine collection, *Anal. Chim. Acta* 261 (1991) 105-113.

10. Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B. K., Ry Chowdhu, T. R., Samanta, G., Chakabrorti, D., Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part I. Arsenic species in drinking water and urine of the affected people, *Analyst* 120 (1995) 643-650.
11. Petropulu, M. O., Varsamis, J., Parissakis, G., Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 323-327.
12. Le, X. C., Ma, M., Speciation of arsenic compounds by using ion-pair chromatography with atomic spectrometry and mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 55-64.
13. Wood, J. M., Biological cycles for toxic elements in environment, *Science* 183 (1974) 1049-1052.
14. Cullen, W. R., Reimer, K. J., Arsenic speciation in the environment, *Chem. Rev.* 89 (1989) 713-764.
15. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, Site: <http://www.iupac.org> (acessado em junho/2006).
16. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., Lobinski, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.
17. Ebdon, L., Hill, S. J., Rivas, C., Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 277-288.
18. Kumaresan, M., Riyazuddin, P., Overview of speciation chemistry of arsenic, *Curr. Sci.* 80 (2001) 837-846.
19. Karthikeyan, S., Hirata, S., Arsenic speciation in environmental samples, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2355-2366.
20. Hill, S. J., Speciation of trace metals in the environment, *Chem. Soc. Rev.* 26 (1997) 291-298.
21. Gómez-Ariza, J. L., Morales, E., Sánchez-Rodas, D., Giráldez, I., Stability of chemical species in environmental matrices, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 200-209.

22. B'Hymer, C., Caruso, J. A., Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 1-13.
23. Ali, I., Jain, C. K., Advances in arsenic speciation techniques, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 947-964.
24. Gómez-Ariza, J. L., Sánchez-Rodas, D., Giraldez, I., Selective extraction of iron oxide associated arsenic species from sediments for speciation with coupled HPLC-HG-AAS, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 1375-1379.
25. Bissen, M., Frimmel, F. H., Speciation of As(III), As(V), MMA and DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 51-55.
26. Vassileva, E., Becker, A., Broekaert, J. A. C., Determination of arsenic and selenium species in groundwater and soil extracts by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 135-146.
27. Yehl, P. M., Tyson, J. F., Towards speciation of arsenic in a standard reference river sediment by high-performance ion chromatography coupled with plasma source mass spectrometry, *Anal. Commun.* 2 (1997) 49-51.
28. Thomas, P., Finnie, J. K., Williams, J. G., Feasibility of identification and monitoring of arsenic species in soil and sediment samples by coupled high-performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1367-1372.
29. Demesmay, C., Olle, M., Application of microwave digestion to the preparation of sediment samples for arsenic speciation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 1116-1121.
30. Garcia-Manyes, S., Jimenez, G., Prado, A., Rubio, R., Rauret, R., Arsenic speciation in contaminated soils, *Talanta* 58 (2002) 97-109.
31. Gallardo, M. V., Bohari, Y., Astruc, A., Potin-Gautier, M., Astruc, M., Speciation analysis of arsenic in environmental solids reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following orthophosphoric acid extraction, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 257-268.
32. Montperrus, M., Bohari, Y., Astruc, A., Potin-Gautier, M., Astruc, M., Comparison of extraction procedures for arsenic speciation in environmental

- solid reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectroscopy, *Appl. Organomet. Chem.* 16 (2002) 347-354.
33. Manning, B. A., Martens, D. A., Speciation of arsenic(III) and arsenic(V) in sediment extracts by high-performance liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrophotometry, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 171-177.
 34. Vela, N. P., Heitkemper, D. T., Stewart, K. R., Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry, *Analyst* 126 (2001) 1011-1017.
 35. Helgesen, H., Larsen, E. H., Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil, *Analyst* 123 (1998) 791-796.
 36. Broeck, K. V., Vandecasteele, C., Geuens, J. M. C., Speciation by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry of arsenic in mung bean seedlings used as a bio-indicator for the arsenic contamination, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 101-111.
 37. B'Hymer, C., Caruso, J. A., Evaluation of HPLC systems for the separation and quantification of arsenic compounds from apple extracts, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 25 (2002) 639-653.
 38. P'Martinez, M., Vinas, P., Fisher, A., Hill, S.J., Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 29-36.
 39. Pizarro, I., Gómez, M., Cámara, C., Palacios, M. A., Arsenic speciation in environmental and biological samples extraction and stability studies, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 85-98.
 40. Gallagher, P. A., Shoemaker, J. A., Wei, X., Brockhoff-Schwegel, C. A., Creed, J. T., Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 71-80.
 41. Mattusch, J., Wennrich, R., Schmidt, A. C., Reisser, W., Determination of arsenic species in water, soils and plants, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 200-203.

42. Le, X. C., Ma, M., Short-column liquid chromatography with hydride generation atomic fluorescence detection for the speciation of arsenic, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1926-1933.
43. Amran, M. B., Lagarde, F. Leory, M. J. F., Determination of arsenic species in marine organisms by HPLC-ICP-OES and HPLC-HG-QFAAS, *Mikrochim. Acta* 127 (1997) 195-202.
44. Velez, D., Ybanez, N., Montoro, R. J., Determination of arsenobetaine in manufactured seafood products by liquid chromatography, microwave-assisted oxidation and hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 91-96.
45. Kirby, J., Maher, W., Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 838-843.
46. Munoz, O., Velez, D., Cervera, M. L. Montoro, R., Rapid and quantitative release, separation and determination of inorganic arsenic [As(III)+As(V)] in seafood products by microwave-assisted distillation and hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1607-1613.
47. Villa-Lojo, M. C., Alonso-Rodriguez, E., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Coupled high performance liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue, *Talanta* 57 (2002) 741-750.
48. Gómez-Ariza, J. L., Sánchez-Rodas, D., Giraldez, I., Morales, E., Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS, *Analyst* 125 (2000) 401-407.
49. Brisbin, J. A., Caruso, J. A., Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analyst* 127 (2002) 921-929.
50. Palácios, M. A., Gomez, M., Camara, C., Lopez, M. A., Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determination by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 209-220.

51. Koch, I., Feldmann, J., Wnag, L., Andrewes, P., Reimer, K. J., Cullen, W. R., Arsenic in the meager creek hot springs environment, British Columbia, Canada, *Sci. Tot. Environ.* 236 (1999) 101-117.
52. Zheng, J., Hintelmann, H., Dimock, B., Dzurko, M. S., Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 14-24.
53. Guerin, T., Molenat, N., Astruc, A., Pinel, K., Arsenic speciation in some environmental samples: a comparative study of HG-GC-QFAAS and HPLC-ICP-MS methods, *Appl. Organometal. Chem.* 377 (2000) 401-410.
54. Feldmann, J., Lai, V. W. M., Cullen, R., Ma, M., Lu, X., Le, X. C., Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1988-1997.
55. Hall, G. E. M., Pelchat, J. C., Gauthier, G., Stability of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) in water samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 205-213.
56. Edwards, M., Patel, S., McNeill, L., Chim, H., Frey, M., Eaton, A. D., Antweiler, R. C., Taylor, H. E., Considerations in As analysis and speciation, *J. AWWA* 90 (1998) 103-113.
57. Gallagher, P. A., Schwegel, C. A., Wei, X., Creed, J. T., Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection, *J. Environ. Monit.* 3 (2001) 371-376.
58. Jókai, Z., Hegoczki, J., Fodor, P., Stability and optimization of extraction of four arsenic species, *Microchem. J.* 59 (1998) 117-124.
59. Lindemann, T., Prange, A., Dannecker, W., Neidhart, B., Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC-ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 214-220.
60. Le, X. C., Yalcin, S., Ma, M., Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: on-site species separation integrated with sample collection, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2342-2347.
61. Gong, Z., Lu, X., Cullen, W. R., Le, X. C., Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1409-1413.
62. Huang, J.-H., Ilgen, G., Blank values, adsorption, pre-concentration, and sample preservation for arsenic speciation of environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 1-10.

63. Sánchez-Rodas, D., Oliveira, V., Sarmiento, A. M., Gómez-Ariza, J. L., Nieto, J. M., Preservation procedures for arsenic speciation in a stream affected by acid mine drainage in southwestern Spain, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1594-1599.
64. Daus, B., Mattusch, J., Wennrich, R., Weiss, H., Investigation on stability and preservation of arsenic species in iron rich water samples, *Talanta* 58 (2002) 57-65.
65. Terlecka, E., Arsenic speciation analysis in water samples: A review of the hyphenated techniques, *Environ. Monit. Asses.* 107 (2005) 259-284.
66. Schoene, K., Steinhanses, J., Bruckert, H. J., König, A., Speciation of arsenic-containing chemical warfare agents by gas chromatographic analysis after derivatization with thioglycolic acid methyl ester, *J. Chromatogr. A* 605 (1992) 257-262.
67. Mester, Z., Pawliszyn, J., Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by solid-phase microextraction-gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 129-135.
68. Grüter, U. M., Kresimon, J., Hirner, A. V., A new HG/LT-GC/ICP-MS multi-element speciation technique for real samples in different matrices, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 67-72.
69. Kresimon, J., Grüter, U. M., Hirner, A. V., HG/LT-GC/ICP-MS coupling for identification of metal(loid) species in human urine after fish consumption, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 586-590.
70. Killelea, D. R., Aldstadt, J. H., Solid-phase microextraction method for gas chromatography with mass spectrometric and pulsed flame photometric detection: studies of organoarsenical speciation, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 169-175.
71. Mothes, S., Wennrich, R., Coupling of SPME and GC-AED for the determination of organometallic compounds, *Mikrochim. Acta* 135 (2000) 91-96.
72. Balis, J. S., Momplaisir, G. M., Marshall, W. D., Determination of arsenobetaine, arsenocholine, and tetramethylarsonium cations by HPLC thermochemical hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1161-1166.
73. Do, B., Alet, P., Pradeau, D., Poupon, J., Guilley-Gaillot, M., Guyon, F., On-line reversed-phase liquid chromatography hydride generation emission

- spectrometry: speciation of arsenic in urine of patients intravenously treated with As_2O_3 , *J. Chromatogr. B* 740 (2000) 179-186.
74. Van Elteren, J. T., Stibilj, V., Slejkovec, Z., Speciation of inorganic arsenic in some bottled Slovene mineral waters using HPLC-HG AFS and selective coprecipitation combined with FI-HG AFS, *Water Res.* 36 (2002) 2967-2974.
 75. Ali, I., Aboul-Enein, H. Y., Speciation of arsenic and chromium metal ions by reversed phase high performance liquid chromatography, *Chemosphere* 48 (2002) 275-278.
 76. Rattanachongkiat, S., Millward, G. E., Foulkes, M. E., Determination of arsenic species in fish, crustacean and sediment samples from Thailand using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 254-261.
 77. Wangkarn, S., Pergantis, S. A., High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 627-633.
 78. Do, B., Robinet, S., Pradeau, D., Guyon, F., Speciation of arsenic and selenium compounds by ion-pair reversed-phase chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometry: Application of experimental design for chromatographic optimisation, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 87-98.
 79. Le, X. C., Cullen, W. R., Reimer, K. J., Speciation of arsenic compounds in some marine organisms, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 1598-1604.
 80. Ma, M., Le, X. C., Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation, *Clin. Chem.* 44 (1998) 539-550.
 81. Koch, I., Wang, L., Ollson, C. A., Cullen, W. R., Reimer, K. J., The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 22-26.
 82. B'Hymer, C., Sutton, K. L., Caruso, J. A., Comparison of four nebulizer-spray chamber interfaces for the high-performance liquid chromatographic separation of arsenic compounds using inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 855-858.
 83. Ackely, K. L., B'Hymer, C., Sutton, K. L., Caruso, J. A., Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 845-850.

84. Le, X. C., Li, X. F., Lai, V., Ma, M., Yalcin, S., Feldmann, J., Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Spectrochim. Acta B* 53 (1998) 899-909.
85. Francesconi, K. A., Micks, P., Stockton, R. A., Irgolic, K. J., Quantitative determination of arsenobetaine, the major water-soluble arsenical in three species of crab, using high pressure liquid chromatography and an inductively coupled argon plasma emission spectrometer as the arsenic-specific detector, *Chemosphere* 14 (1985) 1443-1453.
86. Beauchemin, D., Bednas, M. E., Berman, S. S., McLaren, J. W., Siu, I. W. M., Sturgeon, R. E., Identification and quantitation of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace elements, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2209-2212.
87. Le, X. C., Ma, M., Wong, N. A., Speciation of arsenic compounds using high-performance liquid chromatography at elevated temperature and selective hydride generation atomic fluorescence detection, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4501-4506.
88. Makarov, A., Szpunar, J., The coupling of size-exclusion HPLC with ICP-MS in bioinorganic analysis, *Analisis* 26 (1998) M44-M48.
89. Regnier, F. E., High-performance liquid chromatography of biopolymers, *Science* 222 (1983) 245-252.
90. Nakasato, T., Taniguchi, T., Tao, H., Tominga, M., Miyazaki, A., Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1546-1552.
91. Zhang, X., Cornelis, R., De Kimpe, J., Mees, L., Lameire, N., Study of arsenic-protein binding in serum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Clin. Chem.* 44 (1998) 141-147.
92. McSheehy, S., Pohl, R., Lobinski, R., Szpunar, J., Complementarity of multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray MS-MS for speciation analysis of arsenic in algae, *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 3-15.
93. Shibata, Y., Morita, M., Exchange of comments on identification and quantitation of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace elements, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2116-2118.

94. McSheehy, S., Szpunar, J., Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 79-87.
95. Liu, Y. M., Cheng, J. K., Elemental speciation analysis in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 1993-2012.
96. Liu, W., Lee, H. K., Chemical modification of analytes in speciation analysis by capillary electrophoresis, liquid chromatography and gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 834 (1999) 45-63.
97. Michalke, B., Capillary electrophoresis - inductively coupled plasma - mass spectrometry: A report on technical principles and problem solutions, potencial, and limitations of this technology as well as on examples of application, *Electrophoresis* 26 (2005) 1584-1597.
98. Lin, L., Wang, J., Caruso, J., Arsenic speciation using capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 177-180.
99. Olesik, J. W., Kinzer, J. A., Olesik, S. V., Capillary electrophoresis inductively coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1-12.
100. Michalke, B., Schramel, P., The coupling of capillary electrophoresis to ICP-MS, *Analisis* 26 (1998) M51-M56.
101. Michalke, B., Schramel, P., Capillary electrophoresis interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry for element selective detection in arsenic speciation, *Electrophoresis* 19 (1998) 2220-2225.
102. Huang, Y. -M., Whang, C. -W., Capillary electrophoresis of arsenic compounds with indirect fluorescence detection, *Electrophoresis* 19 (1998) 2140-2144.
103. Howard, A. G., Hunt, L. E., Coupled photooxidation-hydride AAS detector for the HPLC of arsenic compounds, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2995-2998.
104. Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., Ultrasonic extraction followed by sonolysis-ozonolysis as a sample pretreatment method for determination of reactive arsenic toward sodium tetrahydroborate by flow injection-hydride generation AAS, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3732-3736.
105. Carrero, P., Malave, A., Burguera, J. L., Burguera, M., Rondon, C., Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid

- concentration of different reaction media on the generation of arsines, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 195-204.
106. Krivan, V., Arpadjan, S., Radiotracer study of the behavior of arsenic in the graphite-furnace, *Fresenius J. Anal. Chem.* 335 (1989) 743-747.
107. Sperling, M., Yin, X., Welz, B., Differential determination of arsenic(III) and total arsenic using flow injection on-line separation and preconcentration for graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 46 (1991) 1789-1801.
108. Bavazzano, P., Perico, A., Rosendahl, K., Apostoli, P., Determination of urinary arsenic by solvent extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. A comparison with directly coupled high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 11 (1996) 521-524.
109. Pacey, G. E., Ford, J. A., Arsenic speciation by ion-exchange separation and graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry, *Talanta* 28 (1981) 935-938.
110. Grabinski, A. A., Determination of arsenic(III), arsenic(V), monomethylarsonate, and dimethylarsinate by ion-exchange chromatography with flameless atomic absorption spectrometric detection, *Anal. Chem.* 53 (1981) 966-968.
111. Chausseau, M., Roussel, C., Gilon, N., Mermet, J. M., Optimization of HPLC-ICP-AES for the determination of arsenic species, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 476-480.
112. Weeger, W., Lievremont, D., Perret, M., Lagarde, F., Hubert, J. C., Leroy, M., Lett, M. C., Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment, *Biometals* 12 (1999) 141-149.
113. Gettar, R. T., Garavaglia, R. N., Gautier, E. A., Batistoni, D. A., Determination of inorganic and organic anionic arsenic species in water by ion chromatography coupled to hydride generation-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 211-221.
114. Rubio, R., Padró, A., Alberti, J., Rauret, G., Speciation of organic and inorganic arsenic by HPLC-HG-ICP, *Mikrochim. Acta* 109 (1992) 39-45.
115. Huang, B., Zeng, X., Zhang, Z., Lin, J., Recent studies on inductively coupled plasma sample introduction-1: Hydride generation, *Spectrochim. Acta B* 43 (1988) 381-389.

116. Maruta, T., Sudoh, G., Arsine generation and determination of trace amounts of arsenic by atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 77 (1975) 37-42.
117. Burguera, M., Burguera, J. L., Flow injection–electrothermal atomic absorption spectrometry for arsenic speciation using the Fleitmann reaction, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 229-233.
118. Burguera, M., Burguera, J. L., Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples, *Talanta* 44 (1997) 1581-1604.
119. Stumneyer, J., Harazin, B., Wippermann, T., Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 344-351.
120. Stoepler, M., Burow, M., May, K., Padberg, S., Kloster, G., Speciation studies for arsenic and mercury-applications and prospects, *Mikrochim. Acta* 109 (1992) 107-109.
121. Mürer, A. J. L., Abildtrup, A., Poulsen, O. M., Christensen, J. M., Effect of seafood consumption on the urinary level of total hydride-generating arsenic compounds. Instability of arsenobetaine and arsenocholine, *Analyst* 117 (1992) 677-680.
122. Le, X. C., Cullen, W. R., Reimer, K. J., Determination of urinary arsenic and impact of dietary arsenic intake, *Talanta* 40 (1993) 185-193.
123. Lamble, K. J., Hill, S. J., Arsenic speciation in biological samples by on-line high performance liquid chromatography-microwave digestion hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 261-270.
124. Tsalev, D. L., Sperling, M., Welz, B., Speciation determination of arsenic in urine by high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line ultraviolet photo-oxidation, *Analyst* 123 (1998) 1703-1710.
125. Zhang, X., Cornelis, R., De Kimpe, J., Mees, L., Arsenic speciation in serum of uraemic patients based on liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry and on-line UV photo-oxidation digestion, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996) 177-185.
126. Atallah, R. H., Kalman, D. A., *On-line* photo-oxidation for the determination of organoarsenic compounds by atomic-absorption spectrometry with continuous arsine generation, *Talanta* 38 (1991) 167-173.

127. Taniguchi, T., Tao, H., Tominaga, M., Miyazaki, A., Sensitive determination of three arsenic species in water by ion exclusion chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 651-655.
128. Gallagher, P. A., Wei, X., Shoemaker, J. A., Brockhoff, C. A., Creed, J. T., Detection of arsenosugars from kelp extracts via IC-electrospray ionization-MS-MS and IC membrane hydride generation ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1829-1834.
129. Magnuson, M. L., Creed, M. T., Brockhoff, C. A., Speciation of arsenic compounds in drinking water by capillary electrophoresis with hydrodynamically modified electroosmotic flow detected through hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry with a membrane gas-liquid separator, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 689-695.
130. Corr, J. J., Measurement of molecular species of arsenic and tin using elemental and molecular dual mode analysis by ionspray mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 537-546.
131. Pergantis, S. A., Wangkarn, S., Francesconi, K. A., Thomas-Oates, J. E., Identification of arsenosugars at the picogram level using nanoelectrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 357-366.
132. Madsen, A. D., Goessler, W., Pedersen, S. N., Francesconi, K. A., Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 657-662.
133. Pedersen, S. N., Francesconi, K. A., Liquid chromatography electrospray mass spectrometry with variable fragmentor voltages gives simultaneous elemental and molecular detection of arsenic compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 641-645.
134. Lopez, A., Torralba, R., Palácios, M. A., Camara, C., Generation of AsH₃ from As(V) in the absence of KI as prereducing agent - speciation of inorganic arsenic, *Talanta* 39 (1992) 1343-1348.
135. Frenzel, W., Titzenthaler, F., Elbel, S., Selective determination of arsenite by flow-injection spectrophotometry, *Talanta* 41 (1994) 1965-1971.
136. Johnson, D. L., Pilson, M. E. Q., Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate, and phosphate in natural waters, *Anal. Chim. Acta* 58 (1972) 289-299.

137. Sandhu, S. S., Colorimetric method for the determination of arsenic(III) in potable water, *Analyst* 101 (1976) 856-859.
138. Palanivelu, K., Balasubramanian, N., Ramakrishna, T. V., A chemical enhancement method for the spectrophotometric determination of trace amounts of arsenic, *Talanta* 39 (1992) 555-561.
139. Tamari, Y., Yamamota, N., Tsuji, H., Kusaka, Y., Thorium coprecipitation method for spectrophotometric determination of arsenic(III) and arsenic(V) in groundwaters, *Anal. Sci.* 5 (1989) 481-484.
140. Henry, F. T., Thorpe, T. M., Determination of arsenic(III), arsenic(V), monomethylarsonate, and dimethylarsinate by differential pulse polarography after separation by ion exchange chromatography, *Anal. Chem.* 52 (1980) 80-83.
141. Michalke, B., The coupling of LC to ICP-MS in element speciaion. I. General aspects, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 142-153.
142. Michalke, B., Schramel, P., Selenium speciation in human milk with special respect to quality control, *Biol. Trace Elem. Res.* 59 (1997) 45-56.
143. Florence, T. M., Batley, G. E., Removal of trace-metals from seawater by a chelating resin, *Talanta* 22 (1975) 201-204.
144. Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S. *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Blackie, New York, 1992, 380 p.
145. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part I, *Spectroscopy* 16(4) (2001) 38-43.
146. Montaser, A. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Wiley-VHC, New York, 1998, 964 p.
147. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part II: The sample-introduction system, *Spectroscopy* 16(5) (2001) 56-61.
148. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part III: The plasma source, *Spectroscopy* 16(6) (2001) 26-31.
149. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part IV: The interface region, *Spectroscopy* 16(7) (2001) 26-34.
150. Martin, I., Lopez-Gonzalvez, M. A., Gomez, M., Camara, C., Palacios, M. A., Evaluation of high-performance liquid-chromatography for the separation and determination of arsenic species by online high-performance liquid-

- chromatographic hydride generation atomic-absorption spectrometry, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 101-109.
151. Zheng, J., Goessler, W., Kosmus, W., Speciation of arsenic compounds by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Mikrochim. Acta* 130 (1998) 71-79.
152. Wei, X., Brockhoff-Schwegel, C. A., Creed, J. T., Application of sample pre-oxidation of arsenite in human urine prior to speciation *via* on-line photo-oxidation with membrane hydride generation and ICP-MS detection, *Analyst* 125 (2000) 1215-1220.
153. Lintschinger, J., Schramel, P., Hatalak-Rauscher, A., Wendler, I., Michalke, B., A new method for the analysis of arsenic species in urine by using HPLC-ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 313-318.
154. Mandal, B. K., Yasumitsu, O., Suzuki, K. T., Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 371-378.
155. Mattusch, J., Wennrich, R., Determination of anionic, neutral, and cationic species of arsenic by ion chromatography with ICP-MS detection in environmental samples, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3649-3655.
156. Slejkovec, Z., Salma, I., van Elteren, J. T., Zemplen-Papp, E., Speciation of arsenic in coarse and fine urban aerosols using sequential extraction combined with liquid chromatography and atomic fluorescence detection, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 830-834.
157. Schimdt, A. C., Reiser, W., Mattusch, J., Popp, P., Wennrich, R., Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 83-91.
158. Roig-Navarro, A. F., Martinez-Bravo, Y., Lopez, F. J., Hernandez, F., Simultaneous determination of arsenic species and chromium(VI) by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 319-327.
159. Martínez-Bravo, Y., Roig-Navarro, A. F., López, F. J., Hernández, F., Multielemental determination of arsenic, selenium and chromium(VI) species in water by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 265-274.

160. Day, J. A., Montes-Bayon, M., Vonderheide, A. P., Caruso, J. A., A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 664-668.
161. Van Hulle, M., Zhang, C., Zhang, X., Cornelis, R., Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS, *Analyst* 127 (2002) 634-640.
162. Cornelis, R., Zhang, X., Mees, L., Christensen, J. M., Byrjalsen, K., Dyrskel, C., Speciation measurements by HPLC-HG AAS of dimethylarsinic acid and arsenobetaine in three candidate lyophilized urine reference materials, *Analyst* 123 (1998) 2883-2886.
163. Kohlmeyer, U., Kuballa, J., Jantzen, E., Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 965-974.
164. Pansar-Kallio, M., Manninen, P. K. G., Simultaneous determination of toxic arsenic and chromium species in water samples by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 139-146.
165. Ritchie, A. W., Edmonds, J. S., Goessler, W., Jenkins, R. O., An origin for arsenobetaine involving bacterial formation of an arsenic-carbon bond, *FEMS Microbiol. Lett.* 235 (2004) 95-99.
166. DIONEX CORPORATION, "*IonPac AS14 Product Manual*". Document No. 031199-06, Revision 06, Sunnyvale, California, USA, 2003.
167. ELAN Version 3.3 "*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer - Software Guide*". PerkinElmer SCIEX, 2005.
168. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA, AWWA, WEF; 19th ed. Baltimore, Maryland, USA, 1995.
169. Tan, S. H., Horlick, G. Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry, *Appl. Spectrosc.* 40 (1986) 445-460.
170. Entwisle, J., Hearn, R., Development of an accurate procedure for the determination of arsenic in fish tissues of marine origin by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 438-443.
171. Milstein, L. S., Essader, A., Pellizzari, E. D., Fernando, R. A., Akinbo, O., Selection of a suitable mobile phase for the speciation of four arsenic

- compounds in drinking water samples using ion-exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Environ. Int.* 28 (2002) 277-283.
172. Geiszinger, A., Goessler, W., Kuehnelt, D., Francesconi, K., Kosmus, W., Determination of arsenic compounds in earthworms, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2238-2243.
173. Larsen, E. H., Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 53 (1998) 253-265.
174. Fish, R. H., Brinckman, F. E., Jewett, K. L., Fingerprinting inorganic arsenic and organoarsenic compounds in *in situ* oil shale retort and process waters using a liquid chromatograph coupled with an atomic absorption spectrometer as a detector, *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 174-179.
175. Wilkin, R. T., Wallschläger, D., Ford, R. G., Speciation of arsenic in sulfidic waters, *Geochem. Trans.* 4 (2003) 1-7.
176. Hansen, H. R., Raab, A., Jaspars, M., Milne, B. F., Feldmann, J., Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: Major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1086-1091.
177. Londesborough, S., Mattusch, J., Wennrich, R., Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 577-581.