



UFSM

Tese de Doutorado

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG AAS
COM APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E USO DE
MULTIATOMIZADOR**

Diogo Pompéu de Moraes

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2010

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG AAS COM
APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E USO DE MULTIATOMIZADOR**

por

DIOGO POMPÉU DE MORAES

Tese 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 título de DOUTOR EM QUÍMICA.

Santa Maria, RS – Brasil

2010

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 Tese de Doutorado

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG AAS COM
APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E USO DE MULTIATOMIZADOR**

elaborada por

DIOGO POMPÉU DE MORAES

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM-RS)

Prof. Dr. Edson Luiz Seibert (URI-RS)

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva (UNIPAMPA-RS)

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula (UNIPAMPA-RS)

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM-RS)

Santa Maria, 08 de fevereiro 2010.

Dedico este trabalho, em especial, a toda minha Família pelo incentivo e apoio incondicional durante toda a minha trajetória acadêmica. Ao Prof. Érico Flores por todos os ensinamentos transmitidos, conselhos profissionais e pessoais ao longo de todos estes anos. A Juliana S. F. Pereira pela companhia, carinho e dedicação em todos os momentos e, principalmente, durante a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação, pelo incentivo constante ao meu crescimento profissional e científico, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e pela amizade construída durante estes anos de convívio.

Ao Prof. **José Neri G. Paniz** e Prof. **Valderi L. Dressler**, pela co-orientação, pelo exemplo profissional, amizade e pelo auxílio no decorrer das minhas atividades no Setor de Química Industrial e Ambiental.

Ao Prof. **Carlos Alberto Ceretta** e Prof. **Renato Zanella**, pelo incentivo e por toda ajuda na tramitação do processo de estágio de doutorado no exterior (PDDE/CAPES).

À Prof^a **Maria Luiza de Santana Lombas** (Coordenadora Geral de Programas no Exterior/CAPES), pelo apoio e atenção durante a implementação do estágio de doutorado no exterior.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro durante o período de estágio de doutorado no exterior.

Ao Prof. **Jiří Dědina** e Prof. **Tomáš Matoušek**, pela orientação no exterior, amizade e pelo auxílio no decorrer deste trabalho.

Aos Profs. **Edson L. Seibert**, **Fabiana E. B. da Silva**, **Fávero R. Paula** e **Juliano S. Barin**, pela participação como banca examinadora e pelas sugestões feitas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, pela amizade, incentivo e companheirismo demonstrados. Agradeço, em especial, aos colegas Clarissa M. Moreira, Fabiane G. Antes, Fábio A. Duarte, Luis Frederico Rodrigues, Márcia F. Mesko, Juliana S. F. Pereira, Liange O. Diehl e Rochele S. Piccoloto pela colaboração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. ARSÊNIO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	5
2.2. ARSÊNIO EM MEDICAMENTOS	7
2.3. GERAÇÃO DE HIDRETOS.....	8
2.3.1. Formação de hidretos voláteis	9
2.3.2. Pré-concentração	12
2.3.3. Transporte.....	14
2.3.4. Atomização	16
2.3.4.1. Mecanismos térmicos	17
2.3.4.2. Mecanismos de oxidação.....	18
2.3.4.3. Formação de radicais.....	18
2.3.5. Interferências	19
2.3.5.1. Interferências espectrais	19
2.3.5.2. Interferências não-espectrais.....	20
2.3.5.2.1. Interferências em fase líquida.....	20
2.3.5.2.2. Interferências em fase gasosa.....	20
2.3.6. Atomizadores empregados para HG AAS	21
2.3.6.1. Multiatomizador (<i>Multiatomizer</i> - <i>MMQTA</i>)	25
2.3.6.2. Uso da geração de hidretos para a determinação de arsênio.....	29

2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO	30
2.4.1. Preparo de amostras e estabilidade das espécies de arsênio	30
2.4.1.1. Introdução de amostra na forma de suspensão	36
2.4.2. Geração de hidretos aplicada à análise de especiação	40
2.4.3. LC-ICP-MS aplicada à análise de especiação	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	52
3.2. REAGENTES	55
3.3. MATERIAIS DIVERSOS	56
3.4. AMOSTRAS	57
3.4.1. Procedimento de preparo de suspensão do material biológico	57
3.5. MONTAGEM DO SISTEMA DE HG-CT-AAS	58
3.5.1. Procedimento de análise por injeção em fluxo (FIA)	58
3.5.2. Separador gás-líquido (GLS)	59
3.5.3. Preparo do tubo para a etapa de aprisionamento criogênico	61
3.5.4. Frasco de vidro para o procedimento automatizado	62
3.5.5. Multiatomizador	64
3.6. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EMPREGANDO PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E DETERMINAÇÃO POR HG AAS COM MULTIATOMIZADOR (HG-CT-AAS)	65
3.7. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG-CT-AAS	67
3.7.1. Procedimento de extração empregando H_3PO_4	67
3.7.2. Procedimento de extração empregando TMAH	68
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	70
4.1. PREPARO DO SISTEMA DE HG-CT-AAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO	71
4.1.1. Avaliação do resfriamento do separador gás-líquido	78
4.1.2. Avaliação da exatidão do procedimento de HG-CT-AAS	80

4.2. EMPREGO DO PROCEDIMENTO DE HG-CT-AAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As EM MATERIAL BIOLÓGICO POR AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO	82
4.2.1. Otimização do procedimento de HG-CT-AAS	82
4.2.2. Ensaios de recuperação empregando o procedimento de análise de especificação de As em material biológico por HG-CT-AAS	84
4.2.3. Emprego da extração seletiva de compostos de As com H_3PO_4	86
4.2.4. Emprego da solução de hidróxido de tetrametilamônio no preparo de suspensão de material biológico (fígado de frango)	88
4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As EM MEDICAMENTOS	91
4.3.1. Ajuste da vazão de H_2 e ar para maior limite de tolerância e atomização de interferentes	93
4.3.2. Avaliação do emprego de ácido cítrico para a formação de complexo com Sb(V)	95
4.3.3. Avaliação dos ensaios de recuperação em amostras de antimoniato de meglumina	98
4.3.4. Quantificação de As na forma inorgânica em antimoniato de meglumina por HG-CT-AAS empregando o procedimento de calibração por adição padrão	102
4.3.5. Determinação de arsênio total por ICP-MS	106
4.3.6. Análise de especificação de As por LC-ICP-MS	107
4.3.7. Identificação das espécies de arsênio	109
4.3.8. Perfil cromatográfico das diferentes amostras de antimoniato de meglumina	112
4.3.9. Emprego da geração de hidretos acoplada à LC-ICP-MS	121
4.3.10. Alterações no programa de eluição para aumentar a eficiência de separação dos sinais obtidos	123
4.4. COMPARAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DAS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO	124
5. CONCLUSÕES	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica do iAs em organismos vivos	6
Figura 2. Etapas envolvidas na técnica de geração de hidretos	14
Figura 3. Sistemas utilizados para a transferência dos hidretos formados até o atomizador	15
Figura 4. Atomizador com microchama difusa.....	23
Figura 5. Atomizador com chama protegida	24
Figura 6. Modelo de atomizador MMQTA	25
Figura 7. Modelo do novo atomizador MMQTA	27
Figura 8. Foto do frasco de polietileno modificado utilizado como separador gás-líquido na análise de especiação por HG-CT-AAS.....	60
Figura 9. Foto do tubo em "U" de quartzo utilizado no procedimento de aprisionamento criogênico durante a etapa de pré-concentração na determinação de As por HG-CT-AAS	62
Figura 10. Foto do frasco com dupla parede utilizado na etapa de aprisionamento criogênico no procedimento de HG-CT-AAS automatizado.....	63
Figura 11. Multiatomizador de quartzo (<i>multiatomizer</i>) utilizado para a determinação de As	64
Figura 12. Sistema utilizado para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS	65
Figura 13. Etapas envolvidas na análise de especiação de arsênio em amostras biológicas e de medicamento.....	69
Figura 14. Separação das espécies de As obtidas após a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO	72
Figura 15. Cromatogramas obtidos para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO.....	74
Figura 16. Cromatogramas obtidos para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO.....	76

- Figura 17.** Cromatograma obtido para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO empregando o procedimento automatizado de HG-CT-AAS77
- Figura 18.** (A) Sinais obtidos para As na forma inorgânica no antimoniato de meglumina 2000 vezes diluído com água (linha contínua) e seu respectivo sinal de fundo (linha pontilhada). (B) Vista ampliada do sinal analítico para As na amostra de antimoniato de meglumina.....93
- Figura 19.** Absorbância integrada para As na amostra de antimoniato de meglumina 2000 vezes diluída com água (\circ) e solução de referência na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de As (III) na forma inorgânica (\blacklozenge), durante a otimização da vazão de H_2/ar 94
- Figura 20.** Sinais obtidos para determinação de As na forma inorgânica na amostra de antimoniato de meglumina (linha contínua) e respectivo sinal de fundo (linha pontilhada), para o estudo do emprego de ácido cítrico96
- Figura 21.** Absorbância integrada dos brancos (\blacklozenge) e para As na forma inorgânica (\square) em amostras do antimoniato de meglumina (diluição de 2000 vezes com água) em relação à adição de ácido cítrico e mudanças no pH98
- Figura 22.** Ensaio de recuperação de As na amostra de antimoniato de meglumina. As linhas contínuas representam os sinais referentes à solução de referência (na cor azul) e do ensaio de recuperação na amostra de antimoniato de meglumina (na cor vermelha) para As(III) na forma inorgânica, MMA(V), DMA(V) e TMAO na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente99
- Figura 23.** Curva de calibração obtida empregando a técnica de adição padrão para a determinação de As inorgânico em antimoniato de meglumina103
- Figura 24.** Concentração de As em diferentes lotes de antimoniato de meglumina, em relação ao tempo de repouso (diluição de 400 vezes)105
- Figura 25.** Cromatograma obtido após a injeção de 200 μl da solução mista de referência de As na concentração de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, DMA e MMA109
- Figura 26.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da solução de referência de As na concentração de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ como TMAO110
- Figura 27.** Sobreposição de dois cromatogramas obtidos, separadamente, empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da solução mista de referência de As na concentração de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, DMA e MMA (linha azul) e TMAO (linha vermelha)111

- Figura 28.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl da solução mista de referência de As na concentração de 5 µg l⁻¹ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, TMAO, DMA e MMA111
- Figura 29.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl da amostra de antimoniato de meglumina - Lote A, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados112
- Figura 30.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl da amostra de antimoniato de meglumina - Lote B, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados113
- Figura 31.** Cromatograma obtido após empregando a técnica de LC-ICP-MS a injeção de 200 µl da amostra de antimoniato de meglumina - Lote C, previamente diluída (200 vezes) em água113
- Figura 32.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl da amostra de antimoniato de meglumina - Lote D, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados114
- Figura 33.** Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl da amostra de antimoniato de meglumina - Lote E, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados114
- Figura 34.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl para a solução de referência de As na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (Lote A) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).....115
- Figura 35.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl para a solução de referência de As na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (Lote B) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).....116
- Figura 36.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 µl para a solução de referência de As na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (Lote C) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 µg l⁻¹ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).....117

- Figura 37.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS para a injeção de 200 μ l da amostra (Lote A) 50 vezes diluída durante a otimização da concentração de NaBH_4 para a técnica de geração de hidretos, onde as cores representam as concentrações de NaBH_4 de (—) 0,1%, (—) 0,5% e (—) 1,0% (A). Em B é representada uma ampliação do cromatograma obtido para o uso de NaBH_4 1% (m/v)122
- Figura 38.** Perfil do cromatograma obtido para a injeção de 200 μ l da amostra (Lote A) 150 vezes diluída com água na tentativa de aumentar a eficiência de separação dos sinais.....123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais da técnica de ICP-MS	54
Tabela 2. Etapas do programa automatizado para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS	66
Tabela 3. Valores de absorvância integrada para a solução de referência de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO para avaliação do emprego do banho de gelo no GLS.....	79
Tabela 4. Avaliação da exatidão do procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS	81
Tabela 5. Avaliação da exatidão do procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS em amostras biológicas após o emprego do procedimento de extração	87
Tabela 6. Recuperações obtidas para a determinação de As por HG-CT-AAS em material biológico por amostragem de suspensão (10%).....	89
Tabela 7. Estudo do efeito da supressão na absorvância integrada (s) para a solução de referência de As(III) na forma inorgânica em amostra de antimoniato de meglumina (diluição de 2000 vezes em água).....	92
Tabela 8. Recuperações alcançadas para as espécies de As estudadas com e sem emprego da válvula utilizada para a liberação da estibina antes do atomizador	101
Tabela 9. Resultados para a determinação de As(III) na forma inorgânica em diferentes lotes do antimoniato de meglumina (diluição de 400 vezes em água), relacionados ao tempo de repouso após a diluição.....	104
Tabela 10. Resultados obtidos para a determinação de As na forma inorgânica, nos estados de oxidação III e V, em cinco lotes de antimoniato de meglumina por HG-CT-AAS (n = 3).....	106
Tabela 11. Determinação de As total por ICP-MS em cinco lotes de antimoniato de meglumina (n = 3)	107
Tabela 12. Recuperações obtidas para a adição da solução de referência nas amostras de antimoniato de meglumina (n = 3).....	118
Tabela 13. Determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica em amostras de antimoniato de meglumina.....	119

Tabela 14. Somatório da concentração dos sinais não identificados. Resultados em mg l^{-1}	120
Tabela 15. Parâmetros avaliados para a comparação das técnicas empregadas para a análise de especiação de As.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

- 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.
- As(GS)₃, arsino-glutaciona.
- A_{int}, absorvância integrada.
- Alt_{pico}, altura de pico.
- BG, sinal de fundo, do inglês, *background*.
- CF, fluxo contínuo, do inglês, *continuous flow*.
- CRM, material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*.
- CVG, geração química de vapor, do inglês, *chemical vapor generation*.
- d.e., diâmetro externo.
- d.i., diâmetro interno.
- DMA(GS), dimetilarsino-glutaciona.
- DMA(III), ácido dimetilarsenioso.
- DMA(V), ácido dimetilarsínico.
- SD, desvio padrão, do inglês, *standard deviation*.
- ET AAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês, *electrothermal atomization atomic absorption spectrometry*.
- F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*.
- FI, injeção em fluxo, do inglês, *flow injection*.
- FIA, análise por injeção em fluxo, do inglês, *flow injection analysis*.
- FIAS, sistema de análise por injeção em fluxo, do inglês, *flow injection analysis system*.
- FIGS, atomizador com chama protegida, do inglês, *flame-in-gas-shield atomizer*.
- FIT, atomizador com chama interna, do inglês, *flame-in-tube*.
- GC, cromatografia a gás, do inglês, *gas chromatography*.
- GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*.
- GLS, gas liquid separator, do inglês, separador gás-líquido.

HG, geração de hidretos, do inglês, *hydride generation*.

HG-CT-AAS, geração de hidretos com aprisionamento criogênico acoplado à espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, *hydride generation-cryogenic trapping-atomic absorption spectrometry*.

HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês, *high performance liquid chromatography*.

iAs, arsênio inorgânico.

ICP OES, espectrometria de emissão óptica 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*.

LC, cromatografia à líquido, do inglês, *liquid chromatography*.

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

LOD, limite de detecção, do inglês, *limit of detection*.

LOQ, limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*.

m/v, massa por volume.

MDF, atomizador com chama difusa, do inglês, *miniatured diffusion flames*.

MMA(V), ácido monometilarsônico.

MMA(III), ácido monometilarsenioso.

MMA(GS)₂, monometilarsino-glutationa.

MMQTA – *multiatomizer*, atomização em tubo de quartzo com micro chamas, do inglês, *multiple microflame quartz tube atomizer*.

NIST, *National Institute of Standards and Technology*.

PEEK, poliétercetona, do inglês, *polyether ether ketone*.

PTFE, politetrafluoretileno, teflon[®]

QTA, atomização em tubo quartzo, do inglês, *quartz tube atomizer*.

rpm, rotações por minuto.

RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*.

TMA⁺, íon tetrametilarsônio.

TMAH, tetrametil amonium hidroxidade, do inglês, hidróxido de tetrametilamônio.

TMAO(V), óxido de trimetilarsênio.

ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG AAS COM APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E USO DE MULTIATOMIZADOR

Autor: Diogo Pompéu de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Neste trabalho é proposto um procedimento para a análise de especiação de arsênio empregando pré-concentração com aprisionamento criogênico e determinação por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-CT-AAS). O procedimento foi aplicado para a análise de especiação de As em amostra biológica (fígado de frango) e de medicamento (antimoniato de meglumina), sendo que a amostra biológica foi introduzida na forma de suspensão, evitando, assim, o uso de uma etapa de extração. As dimensões e o material utilizado na etapa de aprisionamento foram os critérios escolhidos para avaliar o desempenho de retenção e separação das espécies. O desenvolvimento de um separador gás-líquido (GLS) também foi avaliado. A concentração da suspensão de material biológico, formação de espuma durante a reação de redução com NaBH_4 , uso de tensoativo (Triton X-100) para uniformizar a distribuição das partículas na solução e a concentração da solução de NaBH_4 , foram estudados. Os resultados obtidos com o emprego da amostragem direta de suspensão foram comparados com o procedimento de extração empregando H_3PO_4 diluído e com o uso de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em diferentes concentrações. Materiais de referência certificados de água e tecido biológico foram empregados para a avaliação da exatidão do procedimento. A melhor eficiência de separação entre as espécies de As na forma inorgânica, ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) e óxido de trimetilarsina (TMAO), foi obtida empregando um tubo em "U" de quartzo com 305 mm de comprimento, 2,5 mm d.i. e 24 mm de largura. Utilizando uma solução de NaBH_4 1% (m/v), adição de anti-espumante (1%, m/v) e injeção de 0,5 ml de amostra (suspensão 10%), preparada em 0,5% (m/v) de Triton, a recuperação obtida foi de $71,6 \pm 2,3\%$ para a espécie de As na forma inorgânica. Com o emprego da adição de TMAH (5%, m/v) na suspensão 10% o valor da recuperação de As na forma inorgânica foi de $75,4 \pm 1,9\%$. Cabe ressaltar que os valores das recuperações obtidas para as demais espécies foram da mesma ordem

de magnitude em comparação com a espécie de As na forma inorgânica. Os limites de detecção (LOD) obtidos foram de 0,09, 0,03, 0,04 e 0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as espécies de As na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO, respectivamente. O procedimento de HG-CT-AAS permitiu a análise de especiação de quatro espécies de As com a identificação dos respectivos estados de oxidação. Contudo, devido aos teores de recuperação obtidos não terem sido quantitativos, o procedimento não foi implementado como uma metodologia alternativa para a análise de especiação de As em material biológico com amostragem direta de suspensão.

O procedimento de HG-CT-AAS foi, também, utilizado para a análise de especiação de As no medicamento antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato de meglumina). Foi verificada a supressão do sinal analítico devido à elevada concentração de Sb na matriz do medicamento. Desta forma, o emprego de ácido cítrico (1 a 10%) e a vazão de hidrogênio (15 a 33 ml min^{-1}) e oxigênio (32 a 70 ml min^{-1}) foram estudados para reduzir a formação de SbH_3 e promover maior tolerância à atomização de interferente, respectivamente. O desenvolvimento de uma válvula, previamente à etapa de atomização, para a liberação da estibina (SbH_3) formada, também foi empregada para verificar a redução da ação do interferente. Para as vazões de hidrogênio (21 ml min^{-1}) e oxigênio (45 ml min^{-1}), juntamente como emprego da válvula, as recuperações obtidas foram de $94,9 \pm 3,3$, $103,3 \pm 8,3$, $95,3 \pm 4,7$ e $100,8 \pm 3,3\%$ para as espécies de As na forma inorgânica, MMA, DMA, TMAO, respectivamente. Embora recuperações quantitativas tenham sido obtidas para todas as espécies de As estudadas, apenas a determinação de As na forma inorgânica foi efetuada, visto que não foram identificadas outras espécies de As no medicamento. Os resultados obtidos para a determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica por HG-CT-AAS em cinco lotes do medicamento foram, posteriormente, comparados com os resultados obtidos para a determinação da concentração total de As empregando a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Adicionalmente, a determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica foi feita por cromatografia a líquido (LC) acoplada a ICP-MS. Os resultados obtidos por ICP-MS e LC-ICP-MS foram comparados, individualmente, com os resultados obtidos empregando o procedimento por HG-CT-AAS (teste-*t* com intervalo de confiança de 95%) e não apresentaram diferença estatística. O LOD para a determinação de As na forma inorgânica, para o procedimento proposto, foi de 0,11 $\mu\text{g l}^{-1}$. Portanto, foi possível efetuar a

determinação de As(III) e As(V), na forma inorgânica, no medicamento antimoniato de meglumina, visto que a interferência da matriz foi minimizada com o emprego da HG-CT-AAS. Adicionalmente, o procedimento proposto por HG-CT-AAS possui um custo de montagem e análise, relativamente, baixo quando comparado a outras técnicas como, por exemplo, LC-ICP-MS.

ABSTRACT

ARSENIC SPECIATION ANALYSIS BY HG AAS WITH CRIOGENIC TRAPPING AND USE OF THE MULTIATOMIZER

Author: Diogo Pompéu de Moraes

Advisor: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

In this work a procedure for arsenic speciation using cryogenic trapping coupled to hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-CT-AAS) was developed. Biological (chicken liver) and drug (N-methylglucamine antimonate) samples were investigated and the biological sample was introduced using slurry sampling to avoid the use of an extraction step. The material and the size of the cryogenic trapping tube ("U" tube) were the parameters chosen to check the performance of the cryogenic trapping step and arsenic species separation. The development of a new gas-liquid separator was also investigated. In addition, slurry concentration, foaming formed during the reaction with NaBH_4 , use of surfactant (Triton X-100) to achieve a homogenized particle distribution and the concentration of NaBH_4 were studied. The results obtained using slurry sampling were compared with those using extraction with diluted phosphoric acid and tetramethylammonium hydroxide (TMAH) in different concentration. Water and biological tissue certified reference materials were used to evaluate the accuracy. The best separation efficiency of inorganic arsenic species, monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA) and trimethylarsine oxide (TMAO) was achieved using a quartz "U" tube (305 mm of length, 2.5 mm i.d. and 24 mm of broad). Using 1% (m/v) NaBH_4 , 1% (m/v) anti-foaming and sample injection of 0.5 ml (slurry in the concentration of 10%, m/v), prepared in 0.5% Triton, the recovery for arsenic (in inorganic form) was $71.6 \pm 2.3\%$. With the addition of 5% (m/v) TMAH in the slurry, the recovery was $75.4 \pm 1.9\%$. It is important to point out that the recoveries obtained for the other arsenic species were similar in comparison with arsenic in inorganic form. Limits of detection (LOD) were 0.09, 0.03, 0.04 and $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ for inorganic As, MMA, DMA and TMAO, respectively. Using the proposed procedure by HG-CT-AAS it was possible to analyze four arsenic species with the respective oxidation state. However, due to low recoveries obtained, the procedure was not used as an

alternative for arsenic speciation in biological samples using slurry sampling. Therefore, additional studies could be performed in order to obtain better results.

The procedure HG-CT-AAS was also used for arsenic speciation in N-methylglucamine antimonate (meglumine antimonate) drug. Initially, suppression in the analytical signal was observed due to high concentration of Sb in the matrix sample. Therefore, the use of citric acid (1 to 10%) and hydrogen (15 to 33 ml min⁻¹) and oxygen (32 to 70 ml min⁻¹) flow rate were studied to avoid SbH₃ formation and, consequently, enhance the resistance towards atomization interferences due to more uniform filling of the optical tube volume with H-radicals. The development of a valve, positioned before the atomizer, to release the SbH₃ formed, was used to reduce the interference. Using hydrogen (21 ml min⁻¹) and oxygen (45 ml min⁻¹) and the valve, recoveries of 94.9 ± 3.3, 103.3 ± 8.3, 95.3 ± 4.7 and 100.8 ± 3.1% were obtained for inorganic arsenic species, MMA, DMA, TMAO, respectively. In spite of good recoveries were obtained for all arsenic species studied, only the inorganic arsenic determination was performed, since other species were not observed in the drug samples. The results obtained for inorganic As(III) and As(V) in five samples by HG-CT-AAS were compared with those obtained for total arsenic concentration obtained by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In addition, inorganic As(III) and As(V) determination was performed by liquid chromatography (LC) coupled to ICP-MS. No statistic difference (*t*-test with confidence level of 95%) was observed between the results obtained for total As and As(III) e As(V), determined by HG-CT-AAS with those obtained by ICP-MS and LC-ICP-MS. The LOD for As determination in inorganic form using the proposed procedure was 0.11 µg l⁻¹. Therefore, it was possible to determine As(III) and As(V), in the inorganic form, in low concentrations in the meglumine antimonate drug, since the Sb interference was avoided by HG-CT-AAS. In addition, the proposed procedure presents a relatively, low coast in comparison with other techniques used for arsenic speciation, as LC-ICP-MS.

1. INTRODUÇÃO

É extensamente discutido na literatura que muitos elementos são considerados essenciais à saúde humana, enquanto que outros possuem elevada toxicidade.¹²⁹ No entanto, como a biodisponibilidade dos elementos no organismo, bem como sua acumulação, transporte, armazenamento e interação entre os diferentes elementos químicos na natureza são, significativamente, influenciados, pela forma específica do elemento. Assim, existe um crescente interesse na determinação e distribuição das diversas espécies químicas e estados de oxidação de um elemento químico. Com relação ao arsênio, as espécies trivalentes possuem maior toxicidade em comparação com as pentavalentes, enquanto que os compostos de arsênio inorgânico (iAs) tendem a possuir maior toxicidade que os compostos orgânicos. Desta forma, a informação da concentração total de um elemento não é mais suficiente para avaliações sobre a toxicidade, sendo necessária a determinação das diferentes espécies em um processo chamado de especiação química.^{7,116}

Sob este aspecto, várias técnicas vêm sendo sugeridas para a análise de especiação de arsênio em diversas matrizes.⁸⁷ Embora a análise de especiação de As(III) e As(V) seja comumente reportada na literatura, há poucos estudos envolvendo a identificação e quantificação das espécies metiladas de As, principalmente, o TMAO(V).⁷⁵ O uso da cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) tem se tornado uma tendência na análise de especiação de arsênio. Entre as vantagens associadas ao uso desta técnica, cabe destacar a elevada sensibilidade, os baixos limites de detecção alcançados e detecção seletiva.⁸⁷ Entretanto, vários problemas podem ser encontrados durante a etapa de separação, como a transformação e a decomposição das espécies.

Ademais, na análise por LC-ICP-MS, é necessário utilizar diferentes tipos de colunas cromatográficas, e conseqüentemente, fases móveis variadas para análise de diferentes espécies de As. Neste sentido, a escolha da fase móvel adequada pode ser considerada uma etapa crucial na análise de especiação por LC-ICP-MS, tanto na etapa de separação mas, principalmente, na etapa de detecção, devido à

composição da fase móvel ou presença de contaminantes que podem causar interferências na determinação por ICP-MS. Cabe destacar que a determinação de As por ICP-MS pode, também, ser prejudicada pela presença de Cl que, por sua vez, pode causar interferência poliatômica sobre o As, pela formação do íon $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ com razão massa-carga (m/z) 75, a mesma de As.⁸⁴

O uso da espectrometria de absorção atômica (AAS) acoplada à técnica de geração de hidretos (HG) pode, ainda, ser considerada como uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação de As, devido à elevada versatilidade, facilidade de operação, disponibilidade e, relativamente, adequada sensibilidade.⁷⁵ Além disso, o uso da técnica de HG, seguido de uma etapa de aprisionamento criogênico (CT) e detecção por AAS, é uma das alternativas promissoras para análise de especiação de As onde, geralmente, todas as espécies, incluindo TMAO, podem ser separadas e quantificadas, sem modificações da instrumentação. Neste caso, as espécies voláteis formadas são aprisionadas sob nitrogênio líquido, posteriormente, o sistema é aquecido e ocorre a volatilização e separação das espécies de acordo com seus respectivos pontos de ebulição e propriedades cromatográficas.

Outra vantagem associada a análise por HG-CT-AAS em comparação com a LC-ICP-MS, é que a determinação das espécies de As em amostras biológicas complexas, como por exemplo, tecidos biológicos e urina, pode ser feita diretamente, com mínimo tratamento prévio da amostra. Este fato é extremamente importante com relação à determinação de espécies, relativamente, instáveis de As, como MMA(III) e DMA(III), que podem ser oxidadas a MMA(V) e DMA(V), respectivamente, mesmo em baixas temperaturas.^{31,48} Desta forma, o acoplamento da HG com aprisionamento criogênico à AAS, possibilita a determinação direta das espécies de As (em amostras líquidas), com diferentes estados de oxidação, para matrizes, relativamente, complexas, como por exemplo, amostras biológicas, sendo que a análise deste tipo de amostra por LC-ICP-MS, geralmente, requer o emprego de uma etapa de extração dos compostos de As ligado à proteínas. Além disso, a simplicidade e o relativo baixo custo são fatores que merecem destaque.⁷⁵

Quando se trata de amostras sólidas, a análise de especiação por LC-ICP-MS ou HG-CT-AAS exige que seja aplicada uma etapa de pré-tratamento ou extração das espécies de As da matriz.⁶³ Entretanto, quando se trata de análise de especiação, tem sido extensamente discutido que a etapa de tratamento de amostra é uma etapa crítica, onde perdas das espécies e/ou conversões podem ocorrer.⁴⁷

Uma das alternativas propostas para contornar estas limitações é o uso da amostragem direta de suspensão, onde o tratamento intensivo da amostra pode ser evitado e, ainda, agregando simultaneamente algumas vantagens relacionadas à análise direta de amostras sólidas e líquidas. Contudo, algumas limitações ainda podem ser observadas, principalmente, com relação à estabilidade da suspensão e tamanho de partícula.⁷⁸

Desta forma, devido à grande importância da análise de especiação de As em diversos tipos de amostras, o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a aplicabilidade da geração seletiva de hidretos, utilizando o aprisionamento criogênico e material cromatográfico para a pré-concentração e separação com a posterior determinação por AAS em amostra biológica e de medicamento. Para a análise da amostra biológica, esta foi introduzida na forma de suspensão para minimizar a etapa de pré-tratamento e reduzir a possibilidade de inter-conversão das espécies analisadas. Para o desenvolvimento da técnica de HG-CT-AAS foram feitos estudos da montagem adequada do sistema (dimensões e material do tubo, separador gás-líquido), concentração de anti-espumante e tensoativo, injeção manual e automatizada, entre outros. Além disso, também foram investigados a extração com ácido fosfórico e dissolução da suspensão de material biológico em solução alcalina. Para a avaliação da exatidão dos resultados obtidos empregando o modo de introdução de amostras por suspensão foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs) e ensaios de recuperação.

O procedimento de HG-CT-AAS foi aplicado para análise de especiação de As em medicamentos injetáveis à base de antimoniato de meglumina. Neste caso, foi estudada a necessidade de se utilizar a adição de uma válvula, previamente ao atomizador, para eliminação de interferência. Além disso, para minimizar a interferência de Sb na determinação do As, também foi feito o estudo da vazão dos gases utilizados para a formação de hidrogênio radicalar e adição de ácido cítrico em diferentes concentrações. Com o objetivo de complementar os estudos feitos utilizando HG-CT-AAS, a análise de especiação de As em medicamento também foi feita empregando a técnica de LC-ICP-MS. Neste caso, foram investigadas as condições referentes à separação das espécies de As, como concentração e pH da fase móvel. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação e comparação dos resultados obtidos para as diferentes espécies por HG-CT-AAS e LC-ICP-MS. Ainda, foi feita a determinação de As total por ICP-MS.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão bibliográfica está dividida em 3 partes principais. Na primeira parte será descrita a presença de arsênio em amostras biológicas e em fármacos, sendo estas as amostras empregadas neste trabalho.

Na segunda parte serão descritos os aspectos relacionados à técnica de geração de hidretos, envolvendo os aspectos gerais, uso de etapas de pré-concentração, com ênfase no aprisionamento criogênico, e interferências observadas, para posterior determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica. Também foram discutidos alguns métodos envolvendo a técnica de geração de hidretos acoplada à outras técnicas de determinação e preparo de amostras envolvendo a análise por amostragem direta de suspensão (que foi utilizada neste trabalho).

Na terceira e última parte, serão descritas as principais técnicas analíticas utilizadas para a análise de especiação de arsênio, como HG AAS e LC-ICP-MS, sendo dada maior atenção à HG AAS que foi utilizada para a execução deste trabalho em amostras biológicas e em fármacos. A técnica de LC-ICP-MS foi descrita, brevemente, visto que só foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo a determinação de As em amostras biológicas, que não foi a amostra utilizada neste trabalho para análise por LC-ICP-MS.

É importante destacar que, embora a determinação de diferentes espécies de As seja importante para elucidar mecanismos de toxicidade, biodisponibilidade no organismo e, também, para o controle de qualidade de fármacos empregados no tratamento de doenças, não foram encontrados trabalhos na literatura que descrevam a análise de especiação deste elemento em amostras biológicas e fármacos por HG-CT-AAS e LC-ICP-MS.

2.1. ARSÊNIO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A toxicidade do arsênio é um fenômeno complexo visto que, este elemento pode ser considerado essencial ao organismo humano. Contudo, mundialmente diversas doenças e tipos de câncer estão associados aos elevados níveis de contaminação de arsênio na forma inorgânica (iAs) em águas naturais utilizadas para o consumo humano. Estes efeitos são relacionados à concentração e ao nível de exposição e, atualmente, atingiram o grau de epidemia em determinadas regiões como no sul e leste da Ásia.⁵⁹

É extensamente discutido na literatura que a forma química em que um elemento se encontra no ambiente desempenha um papel fundamental na sua toxicidade, entre outros fatores.^{79,115} Estas diferentes formas químicas em que um elemento pode ser encontrado são chamadas de espécies.

A espécie de As mais tóxica é a espécie mais reduzida (arsina, AsH_3) e a toxicidade é menor com o aumento do estado de oxidação, onde a ordem de toxicidade é $\text{AsH}_3 > \text{arsenito (As(III))} > \text{arsenato (As(V))}$. Os compostos de As inorgânicos trivalente e pentavalente possuem, aparentemente, biodisponibilidade similar. Entretanto, os processos bioquímicos apresentam afinidade diferenciada para as diferentes formas de As, tendo em vista que a forma trivalente liga-se preferencialmente, aos grupos tiol das proteínas.⁵³

Atualmente, o avanço na área de química analítica, principalmente, com relação às técnicas instrumentais, possibilita a identificação e quantificação de diferentes espécies químicas de um mesmo elemento. Segundo a IUPAC (do inglês, *International Union for Pure and Applied Chemistry*), o termo “análise de especiação” tem sido utilizado, freqüentemente, para identificar as espécies químicas de um elemento em um determinado sistema e determinar sua distribuição. Por outro lado, o termo “especiação” refere-se à determinação da distribuição das espécies em uma matriz ou amostra particular. Além disso, para indicar a possível transformação das espécies na análise de especiação, é necessária a definição de alguns termos, conforme mostrado a seguir:¹¹⁵

- *Espécie química*: forma específica de um elemento, em função da sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou forma molecular;

- *Análise de especiação*: atividade analítica de identificar e/ou determinar a concentração de uma ou mais espécies químicas presentes em uma amostra;
- *Especiação de um elemento*: distribuição de um elemento, com uma espécie química definida, em um sistema.

Neste sentido, estudos clínicos têm demonstrado que a toxicidade crônica do iAs está diretamente ligada ao metabolismo deste elemento no organismo. O metabolismo do iAs envolve uma seqüência de reações nas quais o iAs(V) é, geralmente, metabolizado no fígado humano à espécies orgânicas como metilarsênio (MMA) e dimetilarsênio (DMA) em diferentes estados de oxidação (III ou V). Estas espécies metiladas de arsênio têm sido identificadas como os principais produtos do metabolismo do iAs em amostras de urina de ratos expostos ao consumo de água contaminada. Estes produtos foram identificados, recentemente, em células hepáticas humanas tratadas *in vitro* com iAs.³³ Adicionalmente, espécies de trimetilarsênio, como por exemplo óxido de trimetilarsênio TMAO(V), têm sido encontradas na urina de ratos expostos ao MMA(V) ou DMA(V)⁹³ e na urina de indivíduos que foram expostos ao DMA(V)⁷¹ ou arsenoaçúcares⁴⁵. Então, o metabolismo do iAs pode gerar espécies de As(III), As(V), MMA(III), MMA(V), DMA(III), DMA(V) e TMAO(V), conforme o esquema representado na Figura 1.

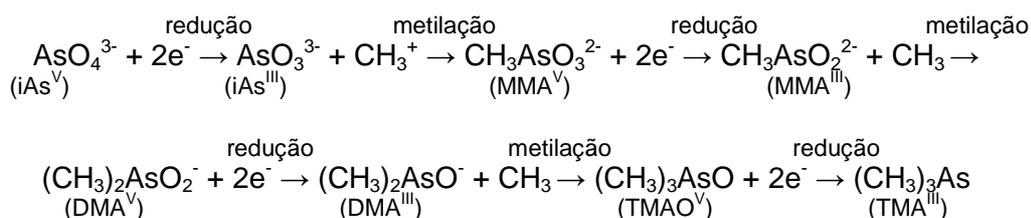


Figura 1. Rota metabólica do iAs em organismos vivos. Adaptado da referência 48.

A análise especiação de compostos de As em amostras biológicas, como tecidos, fluidos e órgãos pode levar ao melhor entendimento das características metabólicas do iAs em organismos vivos contaminados. Estes estudos podem melhor avaliar a manifestação de doenças e o grau de contaminação com iAs.

A análise dos produtos metabólicos do iAs (espécies de As formadas) em amostras biológicas tem se tornado um desafio para a área de química analítica.

Neste sentido, várias técnicas têm sido utilizadas para a análise de especiação dos compostos de As. Contudo, a instabilidade das espécies durante a etapa de amostragem, conservação, pré-tratamento, incompleta recuperação das espécies devido aos efeitos de matriz, falta de materiais de referência certificados (CRM) e padrões são as principais dificuldades na análise de especiação de compostos de As. Além disso, é necessário o emprego de técnicas analíticas com elevada sensibilidade visto que a maioria das espécies pode estar presente em baixas concentrações.³

2.2. ARSÊNIO EM MEDICAMENTOS

Com relação aos produtos farmacêuticos, os compostos de arsênio, principalmente na forma de trióxido de arsênio (As_2O_3), têm sido utilizados há muito tempo como agentes terapêuticos. Apesar dos benefícios, seu uso tem sido restrito devido à toxicidade e propriedades carcinogênicas. Neste caso, os compostos de arsênio inibem a respiração mitocondrial, causando estresse oxidativo e formando espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, podem ser responsáveis por causar mutações no DNA e conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento de tumores cancerígenos.^{35,41,50,104} Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o arsênio pode ser utilizado em tratamentos de algumas doenças, como o câncer, por exemplo.^{35,41,104,123}

Tem sido descrito na literatura que alguns fármacos injetáveis, utilizados no tratamento de doenças como a leishmaniose, podem conter As como contaminante. Desta forma, é extremamente importante a determinação de contaminantes para o controle de qualidade destes fármacos.^{44,135} A leishmaniose é uma doença típica de clima tropical, causada por um protozoário e a transmissão ocorre através de um inseto vetor, normalmente, o mosquito. A doença pode se manifestar na forma cutânea, formando úlceras na pele, geralmente, na face, pernas e braços. Ainda, pode ocorrer a manifestação na forma cutânea crônica onde esta se assemelha à lepra e dificilmente pode ser tratada. Outros tipos da doença se manifestam nas mucosas, onde ocorre a destruição das mucosas (nariz, boca) e na forma visceral, causando perda de peso, anemia, entre outros sintomas.¹²⁹ Esta doença pode ser tratada utilizando fármacos à base de antimônio (V), contendo, aproximadamente,

81000 mg l⁻¹ de Sb(V).⁴⁴ Devido à similaridade das propriedades do As e Sb, com relação ao transporte, carreamento e bombeamento pelas células e sistemas biológicos, alguns autores reportam que a presença de As(V) nos fármacos pode causar a redução do Sb(V) para Sb(III).¹³⁵ Desta forma, a presença de As em fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose, à base de antimoniato de meglumina, é bastante crítica, visto que na forma em que é encontrado, sua biodisponibilidade no sangue e sistema circulatório é aumentada.⁴⁴

O desenvolvimento de técnicas analíticas específicas para a determinação de contaminantes inorgânicos tem sido introduzido no campo de pesquisa e análise das ciências farmacêuticas. Atualmente, a tarefa do químico analítico na análise de produtos farmacêuticos não se refere somente ao controle de qualidade, mas também inclui o desenvolvimento de novas metodologias analíticas em conjunto com a modernização de técnicas instrumentais.^{4,60,95,108}

2.3. GERAÇÃO DE HIDRETOS

No início de 1950 a técnica de geração de hidretos (HG) foi introduzida para a determinação de As e outros elementos utilizando métodos colorimétricos, como por exemplo, os ensaios de Marsh e Gutzeit.⁶ Holak⁵⁵, em 1969, foi pioneiro no emprego da técnica de geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica (AAS) para a determinação de As.^{128a} Desde então, a geração de vapor químico (CVG) combinada com a espectrometria de absorção atômica como técnica de detecção na forma de geração de vapor frio (CV AAS) para a determinação de Hg e Cd e geração de hidretos (HG AAS) para elementos formadores de hidretos voláteis (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn, Te e mais recentemente In, Pb e Tl) têm sido aplicada como ferramenta analítica para a determinação destes elementos.⁷⁶

As etapas do processo de geração de hidretos envolvem a formação de hidretos voláteis, pré-concentração (quando necessária), transporte até o atomizador e decomposição do hidreto em fase gasosa para formação de átomos no estado fundamental. A seguir, cada uma destas etapas será brevemente abordada, visto que a técnica de geração de hidretos é uma técnica consolidada. Posteriormente, serão enfatizados os aspectos relacionados ao emprego dos procedimentos de pré-

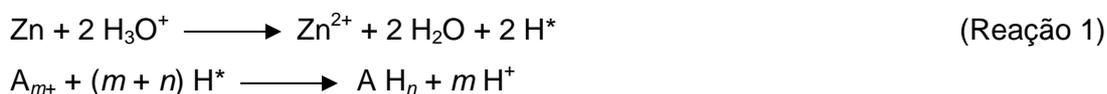
concentração para a especiação de As em pH seletivo empregando a técnica de geração de hidretos.

Cabe ressaltar, que a técnica de geração de hidretos possui diversas vantagens sob o método convencional de introdução de amostras empregando a nebulização pneumática. O aumento da eficiência de transporte do analito (próximo a 100%), separação da matriz, elevada seletividade, automação, possibilidade do emprego de elevado volume de amostra, possibilidade de análise de especiação e relativo baixo custo de operação estão entre as principais vantagens associadas à técnica de HG.^{111,112,131} Entretanto, uma das limitações associadas à técnica de HG, é que poucos elementos formam hidretos voláteis e estáveis à temperatura ambiente.³⁸

Alguns fatores podem dificultar a etapa de geração e/ou volatilização dos hidretos, principalmente, em virtude da presença de interferentes e contaminantes na amostra que competem pela formação dos hidretos. Além disso, podem provocar interferências na etapa de atomização pela redução da concentração das espécies radicalares na célula de atomização no acoplamento HG AAS.^{29c,128c}

2.3.1. Formação de hidretos voláteis

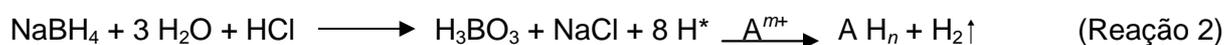
Inicialmente, a geração de hidrogênio nascente (hidrogênio radicalar) para a conversão do analito presente na solução em hidreto volátil era produzida empregando um metal na forma sólida (Al, Sn ou Zn) em meio ácido. A geração de hidrogênio nascente a partir da reação de Zn metálico na forma sólida em meio ácido pode ser observada conforme mostrado na reação abaixo.



onde A_{m+} é o elemento a ser determinado.^{29a}

Contudo, a dificuldade de obtenção de metais com elevada pureza e a retenção das espécies voláteis na superfície das partículas sólidas remanescentes do metal no meio reacional constituíam às principais desvantagens desta técnica para a determinação de elementos em baixas concentrações.^{29a} Em virtude destes

fatores, a técnica de geração de hidretos não foi amplamente aceita. A introdução do tetraidroborato de sódio em meio ácido como agente redutor na reação de geração de hidretos permitiu a redução dos brancos analíticos, maior controle da taxa reacional e menor tempo de reação. Adicionalmente, como a decomposição do NaBH_4 (conforme mostrado na reação 2) é completa e, praticamente, instantânea menor quantidade do agente redutor é necessária no meio reacional.^{29a,128a} Contudo, a eficiência da reação depende, obrigatoriamente, de alguns fatores, como: (i) elevado rendimento dos produtos da reação; (ii) pré-tratamento químico para obter o elemento no estado de oxidação desejado e, com isso, sua reatividade química; e (iii) controle do pH, onde não podem ocorrer mudanças significativas na acidez, temperatura e volume durante a etapa de geração dos hidretos.^{29a,120}



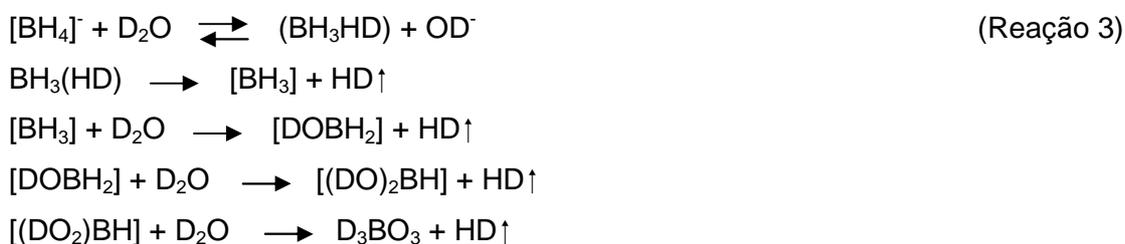
onde A_{m+} é o elemento a ser determinado.^{29a}

Apesar da explicação dos mecanismos mostrados acima para a geração de hidrogênio nascente, estudos recentes foram descritos na literatura contestando o mecanismo de redução. No entanto, apesar da ampla investigação destas reações, ainda não existe um mecanismo de redução que seja aceito em comum acordo pela comunidade científica.⁶⁶ Desta forma, os mecanismos de redução podem ser classificados em dois grupos: (i) baseados na formação de hidretos a partir da geração de hidrogênio nascente na solução e (ii) os que sugerem a formação de hidretos a partir de intermediários gerados na hidrólise do NaBH_4 .²⁶

O mecanismo de geração de hidretos a partir da hidrólise do NaBH_4 tem sido proposto por D'Ulivo *et al.*¹³ O estudo comprovou que, os agentes redutores utilizados (tetraidroborato de sódio, borana de amônia, $\text{H}_3\text{B-NH}_3$ e tributil-amina-borana, $\text{H}_3\text{B-NH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) foram hidrolisados, em pH de 5 a 12, com posterior formação dos hidretos de Bi, Sb e Sn. Nestas condições, a fração dos reagentes decomposta não foi suficiente para produzir a concentração mínima estequiométrica de hidrogênio nascente necessária para a formação dos hidretos conforme as reações 1 e 2, mostradas anteriormente. Os autores salientaram que as evidências experimentais reforçam que a única explicação plausível na tentativa de elucidar o mecanismo de geração dos hidretos seria a transferência direta do hidrogênio ligado ao boro para o analito ao invés da reação do analito com o hidrogênio nascente.

Em outro trabalho, a teoria de formação de hidrogênio nascente a partir da decomposição do tetrahidroborato foi questionada baseada em considerações termodinâmicas. A formação de hidrogênio radicalar foi investigada baseada no potencial padrão de formação (E^0) dos pares das reações de redução. Como o E^0 para o par H^+/H é -2,106 V e os E^0 dos pares Zn^{2+}/Zn e H_3BO_3/BH_4^- é -0,763 e -0,482 V, respectivamente, o Zn e o BH_4^- não são capazes de promover a redução do hidrogênio ácido à hidrogênio radicalar.⁶⁷

Posteriormente, outro estudo foi feito com o objetivo de comprovar que, durante a decomposição do tetrahidroborato, ocorria a formação de hidrogênio molecular ao invés de hidrogênio nascente. Este fato foi comprovado com o uso de reagentes deuterados, KBD_4 em H_2SO_4 3 mol l^{-1} ⁸¹ e $NaBH_4$ em D_2O ⁹⁷ ou D_3O^+ ^{64,97} resultando na formação de HD (hidrogênio molecular), como principal produto (superior a 90%). Este fato comprova que o tetrahidroborato sofre decomposição, tanto em meio ácido ou básico, onde os hidrogênios interagem com H_2O ou H_3O^+ , formando hidrogênio molecular.²⁰ A Reação 3 mostra a formação de hidrogênio molecular a partir da decomposição do tetrahidroborato.⁸⁰



Posteriormente, D'Ulivo *et al.*¹⁹ verificaram que o mecanismo de geração de hidretos empregando tetrahidroborato(III) e amino-boranas leva à formação de complexos entre o analito e as boranas. Estes intermediários percorrem diferentes rotas reacionais caracterizadas por rearranjos, transferência de hidretos e hidrólise. Os autores destacaram que, usando proporções estequiométricas e condições reacionais moderadas, três diferentes rotas reacionais foram identificadas levando à formação de hidretos completamente hidrogenados, dímeros formados por ligação metal-metal e derivados metálicos produzidos a partir da transferência de grupamentos metálicos. Em condições reacionais com elevada concentração de tetrahidroborato(III) e elevada acidez, os intermediários foram, preferencialmente,

convertidos a hidretos voláteis completamente hidrogenados devido a rápida reação de transferência do hidrogênio seguida pela hidrólise dos intermediários.

A formação de intermediários no mecanismo de geração de hidretos voláteis, a partir da hidrólise do tetrahidroborato(III) e amino-boranas em meio ácido foi investigada por D'Ulivo *et al.*²¹ Foi observado que a formação dos intermediários foi fortemente dependente do pH do meio e da composição da solução. Cabe ressaltar que a taxa de hidrólise do tetrahidroborato(III) e amino-boranas na faixa de pH entre 3,8 a 14 não foi semelhante à taxa de hidrólise destes reagentes em meios fortemente ácido comumente utilizados na técnica de geração de hidretos. Desta forma, a taxa de hidrólise destes reagentes em pH superior a 3,8 é significativamente mais lenta quando comparada à meios fortemente ácidos, evidenciando que o mecanismo de redução ocorre pela formação de complexos com posterior transferência do hidrogênio do boro para o íon.

Atualmente, vários estudos têm sido feitos na tentativa de elucidar a formação de intermediários a partir da hidrólise/decomposição do tetrahidroborato.^{14,18,20,70} Apesar disto, muitas contradições das teorias propostas ainda são encontradas na literatura.

2.3.2. Pré-concentração

A retenção das espécies de interesse, previamente, à introdução no sistema de detecção promove o aumento da sensibilidade. Desta forma, os efeitos de diluição por ação do gás de arraste e/ou gases produzidos pela decomposição dos reagentes são minimizados. Neste sentido, na análise de especiação a determinação de espécies em baixas concentrações muitas vezes se faz necessária e, assim, o emprego da etapa de pré-concentração é amplamente difundido.⁹⁶ Como mencionado anteriormente, Holak foi o pioneiro no emprego do acoplamento HG AAS para a determinação de As onde foi utilizada uma etapa de pré-concentração do analito por meio do método de aprisionamento criogênico com posterior volatilização por aquecimento.⁵⁵

O método de aprisionamento criogênico consiste no uso de um tubo de vidro ou quartzo em forma de "U" imerso em nitrogênio líquido. Outras substâncias, como uma mistura de gelo seco com acetona, podem ser utilizadas para a retenção da

espécie volátil de interesse. Adicionalmente, a etapa de aprisionamento criogênico pode ser acoplada à técnicas de separação, como por exemplo, a cromatografia a gás (GC). Além da possibilidade de pré-concentrar as espécies, outra vantagem associada ao uso do aprisionamento criogênico, consiste no fato de que espécies instáveis e/ou reativas são isoladas e com isso reduzem, significativamente, a possibilidade de alteração e/ou decomposição.^{29b,57,128a}

Com relação à especiação de As, as diferentes espécies são retidas, geralmente, em nitrogênio líquido e são volatilizadas sob aquecimento sendo, então, separadas de acordo com seus respectivos pontos de ebulição. Com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a resolução entre as espécies metiladas de As, alguns autores preenchem o tubo com lã de vidro e/ou materiais cromatográficos, como por exemplo, fases estacionárias utilizadas em análises cromatográficas. Além disso, uma etapa prévia de silanização pode minimizar perdas de analito por adsorção na superfície do tubo e obter uma melhor resolução. Melhores limites de detecção (LODs), de até duas ordens de grandeza, são alcançados com o emprego da etapa de pré-concentração quando comparada à determinação na forma direta. Ademais, o uso do aprisionamento criogênico possibilita separação do analito de alguns interferentes, como por exemplo, do H₂ produzido pela decomposição do NaBH₄. Este fato é fundamental para o emprego da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) acoplada à técnica de HG, visto que neste caso o hidrogênio pode modificar as condições do plasma.^{58,29d}

O manuseio de líquidos criogênicos e a montagem do sistema são as principais dificuldades relacionadas ao emprego da etapa de aprisionamento criogênico. Existem outras possibilidades de execução da etapa de pré-concentração, como mostrado na Figura 2. Apesar das dificuldades, o aprisionamento criogênico tem sido comumente aplicado para a análise de especiação de As em diversos tipos de amostras (ver item 3.2 *Geração de hidretos*).

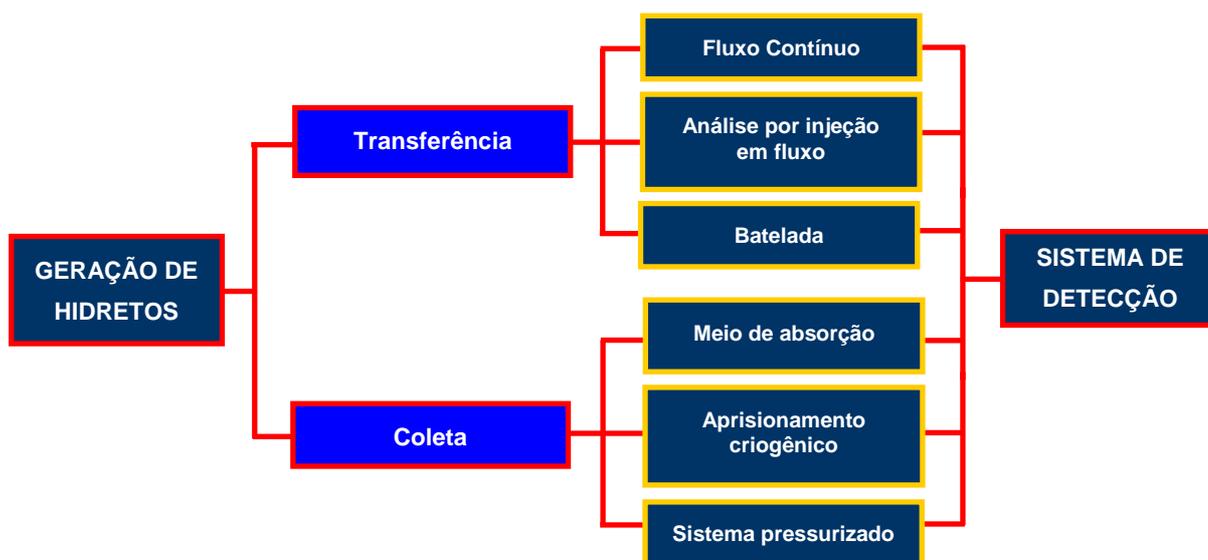


Figura 2. Etapas envolvidas na técnica de geração de hidretos. Adaptado de Dedina, J.^{29a}

2.3.3. Transporte

A etapa de transporte do hidreto volátil gerado até a célula de atomização é, geralmente, definida como a segunda etapa do procedimento analítico da técnica de geração de hidretos. Os hidretos podem ser transportados diretamente até o atomizador ou inicialmente coletados para subsequente detecção, utilizando a etapa de pré-concentração (ver item 2.3.2. Pré-concentração). Em muitos casos, o transporte pode ser direto se: (i) a quantidade do analito presente na amostra é suficientemente alta para a sua determinação direta, (ii) os compostos co-gerados com o analito (H_2 , vapor de água, elevada concentração do íon sódio ou excesso de BH_4^-) são compatíveis com o sistema de detecção e (iii) o sistema de detecção é adequado.¹¹⁰

O transporte direto do hidreto formado tem sido simplificado pelo uso de reatores, separadores gás-líquido e câmaras de nebulização.^{40,103} Apesar do uso destes dispositivos para o transporte de forma direta, a retenção de hidretos na superfície de materiais poliméricos ou de vidro pode ser significativa e, assim, os hidretos gerados podem sofrer decomposição e/ou adsorção. Ainda, a elevada solubilidade de alguns hidretos em água pode dificultar o transporte do hidreto gerado e prejudicar a reprodutibilidade das medidas, como por exemplo, a

determinação de As a partir de AsH_3 pode ser dificultada pela elevada solubilidade desta espécie ($0,7 \text{ mg ml}^{-1}$). Estes efeitos atuam diretamente na eficiência de transporte do hidreto formado até o atomizador. Na maior parte dos trabalhos descritos na literatura, os hidretos são transportados até a célula de atomização com o emprego de um gás de arraste inerte, geralmente, argônio.

Vários modos de transferência direta são amplamente empregados como sistemas em fluxo contínuo (CF), análise por injeção em fluxo (FIA) e sistemas em batelada (Figura 3).

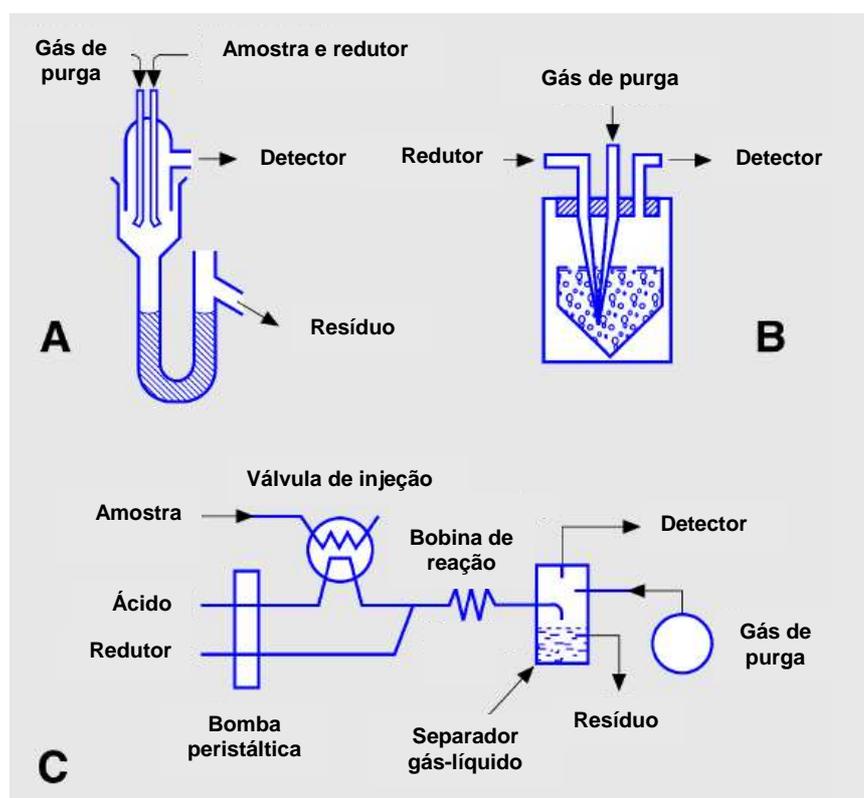


Figura 3. Sistemas utilizados para transferência dos hidretos formados até o atomizador. Onde **A** é o sistema em fluxo contínuo, **B** é o sistema em batelada, **C** é o sistema de análise por injeção em fluxo. Adaptado de Sturgeon, R. E.¹¹¹

A escolha do método de transferência do hidreto até a célula de atomização está diretamente relacionada, entre outros fatores, com a estabilidade do hidreto formado. O emprego de sistemas em batelada possibilita o uso de maior volume de amostra o que muitas vezes pode ser necessário para atingir um melhor LOD. Entretanto, o elevado volume morto dos reatores, geralmente, empregados nos sistemas em batelada pode produzir a diluição do sinal analítico. Adicionalmente, a adição manual dos reagentes e amostra consome mais tempo durante a análise e a

repetitividade pode ser pior quando comparada aos sistemas de injeção em fluxo. A possibilidade do emprego de uma etapa automatizada nos sistemas em batelada é bem reduzida.

Os sistemas em fluxo contínuo e de análise de injeção em fluxo possuem características em comum como, por exemplo, o emprego de capilares para as reações de geração de hidretos e o uso de separador gás-líquido para a remoção do analito na forma de vapor da fase aquosa. Outra vantagem consiste na possibilidade de automação em ambos os sistemas e, além disso, a etapa de preparo de amostras pode ser incorporada diretamente nestes sistemas.

Nos sistemas em CF, os reagentes e amostra são transportados continuamente em capilares e após a reação o analito volátil é separado da fase aquosa. O sinal produzido é independente do tempo e a absorbância é proporcional à concentração do analito. Enquanto que, os sistemas FIA empregam uma solução carreadora, geralmente, água ou ácido diluído e a amostra é injetada em intervalos regulares de tempo. Desta forma, o sinal produzido é dependente do tempo e sua forma está diretamente relacionada com a dispersão do analito na solução carreadora. A principal diferença quando comparado aos sistemas em CF é que nos sistemas FIA não é necessário alcançar o tempo de equilíbrio para a reação antes da análise. Devido ao preciso controle das condições reacionais, a repetitividade é excelente mesmo que o tempo de equilíbrio para a reação não seja alcançado. O baixo consumo de amostra, possibilidade de miniaturização e a alta frequência analítica são outras vantagens do sistema FIA.^{39,128b}

2.3.4. Atomização

A eficiência da etapa de atomização depende uma série de critérios que devem ser otimizados com o objetivo de alcançar melhor exatidão e a melhor razão sinal-ruído. Entre estes fatores, cabe destacar:²³

- conversão completa do analito em átomos no estado fundamental e gasoso;
- nenhuma reação entre os átomos no estado fundamental e gasoso deve ser observada durante a etapa de atomização;

- maior tempo de residência dos analitos no atomizador. Contudo, à medida que o tempo de residência aumenta pode ocorrer uma maior tendência de formação de reações paralelas no interior do atomizador;
- mínima contribuição para o aumento de variação da linha de base;
- possibilidade de efetuar a etapa de pré-concentração no atomizador;
- fácil operação, elevada robustez e baixo custo.

A decomposição dos hidretos em fase gasosa e, portanto, etapa de atomização pode ser efetuada por mecanismos térmicos, reações de oxidação e mecanismos envolvendo radicais. Contudo, estes mecanismos não são completamente compreendidos e não atuam individualmente. A predominância do mecanismo de atomização vai depender do elemento a ser determinado, composição do gás carreador, tipo atomizador e temperatura.

2.3.4.1. Mecanismos térmicos

O mecanismo de atomização baseado na decomposição térmica do hidreto foi um dos primeiros mecanismos propostos para explicar o processo de atomização na técnica de HG AAS. Segundo estudos termodinâmicos feitos para o SeH_2 , por exemplo, foi calculada a constante de equilíbrio na faixa de temperatura de 600 a 2000 °C. A predição teórica para a decomposição de SeH_2 foi de 800 °C porém, experimentalmente, foi constatado que a máxima intensidade do sinal analítico foi obtida na temperatura de 700 °C, mostrando que o processo de atomização do hidreto não ocorre somente por mecanismos térmicos.² Além disso, algumas contradições foram encontradas em relação a este mecanismo. Para a decomposição da AsH_3 , por exemplo, foi constatado que a máxima intensidade do sinal analítico foi obtida na faixa de temperatura de 800 a 900 °C, no entanto, a completa atomização do As empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) foi alcançada na faixa de 1700 a 1900 °C.^{29b,128c}

2.3.4.2. Mecanismos de oxidação

Este mecanismo foi baseado em estudos da interação do hidreto volátil com o oxigênio gasoso durante a etapa de atomização. Alguns autores sugerem que a menor temperatura necessária para a atomização do AsH₃ e SbH₃ na presença de oxigênio resulta da formação de dímeros destas duas espécies, segundo a Reação 5.⁹¹



Como mostrado na Reação 5, o excesso de oxigênio pode provocar a formação de óxidos. Adicionalmente, os autores mencionaram que a adição de hidrogênio pode diminuir a formação de óxidos. Porém, a adição de oxigênio e hidrogênio simultaneamente, produz espécies radicalares que podem atuar nas reação de atomização dos hidretos.⁶⁶

2.3.4.3. Formação de radicais

Alguns estudos na literatura reportam que ocorre um aumento do sinal analítico com o uso de uma mistura de hidrogênio e oxigênio no gás de arraste.^{128c} Na tentativa de explicar este efeito, Dedina e Rubeska²⁸ investigaram a atomização do SeH₂ em uma chama formada por uma mistura de hidrogênio/oxigênio em uma célula de quartzo não aquecida. Desta forma, os autores propuseram um mecanismo de atomização baseado na colisão do hidreto com o hidrogênio radicalar. Conforme os autores, na zona de reação da chama hidrogênio/oxigênio são formados radicais que reagem, posteriormente, para formar outras espécies radicalares que auxiliam na atomização dos hidretos voláteis (Reação 6).^{29c}



Posteriormente, os mesmos autores²⁸ investigaram os mecanismos de formação de espécies radicalares em diferentes tipos de atomizadores. Após estes

estudos, foi concluído que o processo de redução da concentração dos átomos no estado fundamental e gasoso ocorre por difusão das espécies no interior do atomizador por ação do gás de arraste e por reações paralelas que formam espécies moleculares. Adicionalmente, foi constatado que os analitos podem ser reatomizados, desde que entrem em contato com novas espécies radicalares.

2.3.5. Interferências

Apesar da técnica de HG possuir algumas vantagens em comparação ao uso do sistema de nebulização convencional, algumas interferências podem ser observadas. As interferências associadas à técnica de geração de hidretos podem ser divididas em dois grupos: espectrais e não-espectrais. As interferências não-espectrais se subdividem em interferências em fase líquida e interferências em fase gasosa.^{29c}

2.3.5.1. Interferências espectrais

Devido à separação do analito da matriz, as interferências espectrais na técnica de geração de hidretos não são muito pronunciadas quando comparadas com a técnica convencional de introdução da amostra empregando a nebulização pneumática. Contudo, pode ser observada a absorção não específica da radiação quando uma quantidade significativa de hidretos voláteis (analito e interferente) é transportada para o atomizador. Além disso, a absorção da radiação não específica tem sido verificada para a presença de compostos moleculares, principalmente, oxigênio e hidrogênio, em comprimentos de onda próximos ao ultravioleta. Estudos feitos para As, Sb e Se na faixa de temperatura de 320 a 1070 °C apresentaram um intenso sinal de absorção molecular para o As e Sb, enquanto que o Se e outros analitos não apresentaram o mesmo comportamento. Este intenso sinal foi relacionado a formação de dímeros e, mais especificamente para o As, foi observado um máximo de absorção em 225 nm, que corresponde a formação do dímero As-As.^{29c}

2.3.5.2. Interferências não-espectrais

2.3.5.2.1. Interferências em fase líquida

As interferências na fase líquida ocorrem devido às modificações na taxa de liberação dos hidretos na solução e/ou redução da eficiência da geração dos hidretos. Estas interferências podem ser causadas pela presença de concomitantes na amostra.^{29c} Adicionalmente, interferências não-espectrais em fase líquida podem surgir se o estado de oxidação e/ou a espécie química do analito na amostra não são as mesmas nas soluções padrão de calibração, ocorrendo assim, diferentes taxas de formação dos hidretos. A forma química do analito a ser determinado também é muito importante, principalmente, em amostras biológicas onde muitas vezes se faz necessário aplicar uma etapa prévia de decomposição para a quebra da ligação entre os compostos orgânicos e o analito. Contudo, a etapa prévia de decomposição modifica a forma química e altera o estado de oxidação do analito impossibilitando a posterior análise de especiação.¹³¹

Interferências por ação de componentes presentes na matriz também podem alterar a eficiência da geração de hidretos, principalmente, pelo emprego de ácidos inorgânicos na etapa prévia de decomposição, como por exemplo, de ácido nítrico⁴² e fluorídrico¹⁷. O efeito da presença de HNO_3 está relacionado ao elevado sinal de fundo devido a presença de NO_2^- no atomizador e/ou oxidação das espécies em fase gasosa. Em contrapartida, o efeito da interferência da presença de HF está relacionado à formação de complexos entre o analito e o flúor.

Geralmente, o mecanismo de interferência pela ação de ácidos redutores (por exemplo, HCl) pode ser explicado pela redução preferencial do íon interferente para a forma metálica sólida que por sua vez, pode provocar a adsorção do hidreto gasoso seguida de sua decomposição.^{65,127}

2.3.5.2.2. Interferências em fase gasosa

As interferências em fase gasosa são causadas pela presença de espécies voláteis, mais frequentemente por hidretos, mas também por outros compostos ou por micro-gotas de água (*spray*) presentes no reator. Estas interferências podem

ocorrer na superfície ou no volume morto do gerador, tubulação e no atomizador. Um dos tipos de interferências em fase gasosa, interferência de transporte, podem ser de ordem cinética ou podem atuar na eficiência de geração. Enquanto que, as interferências na etapa de atomização dependem do mecanismo de atomização, do analito a ser determinado e do atomizador utilizado. Na etapa de atomização as interferências podem ser minimizadas pela otimização de fatores como: vazão do gás de arraste, temperatura da célula de atomização e presença de oxigênio.^{29c,65,131}

2.3.6. Atomizadores empregados para HG AAS

Desde o surgimento da técnica da geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica para a determinação de hidretos voláteis, vários modelos de atomizadores de quartzo têm sido utilizados. O modelo de atomizador de quartzo na forma de “T” foi amplamente empregado na maioria dos trabalhos descritos na literatura.^{29b}

O suposto mecanismo de atomização é baseado na reação do hidreto formado com hidrogênio radicalar no interior ou na superfície do atomizador. Neste sentido, mesmo que o modelo do atomizador seja diferente é necessária a presença de hidrogênio radicalar para o processo de atomização. No caso do uso de atomizador em tubo de quartzo (QTA do inglês, *quartz tube atomizer*), aquecido externamente por uma chama ou resistência elétrica, a formação do hidrogênio radicalar é devido à reação entre o hidrogênio, proveniente da decomposição do NaBH_4 , e o oxigênio presente na solução carreadora, amostra ou como contaminante nos gases utilizados. Cabe destacar que, a reação de formação de radicais é catalisada em temperaturas elevadas.²³ Os atomizadores de quartzo aquecidos externamente e os atomizadores com chama interna (FIT do inglês, *flame-in-tube*) possuem o mesmo mecanismo de atomização, no entanto, existem diferenças significativas entre os atomizadores. No FIT não é necessário utilizar uma fonte de aquecimento externa, no entanto, o gás carreador deve conter uma grande quantidade de hidrogênio suficiente para suportar a microchama no interior do atomizador. O controle da microchama é baseado no fornecimento de oxigênio através de um tubo capilar localizado entre o tubo de quartzo principal e o tubo de injeção (junção “T” do atomizador). O hidrogênio radicalar formado fica confinado na

pequena porção da chama de maneira que a distribuição dos radicais não é uniforme ao longo de todo o atomizador.¹⁵

As principais diferenças entre o QTA e o FIT são:

- (i) QTA - aquecimento externo e gases contendo uma pequena fração de H_2 e O_2 ; FIT - microchama formada pela grande quantidade de H_2 e O_2 sem aquecimento externo;
- (ii) QTA - mobilidade dos radicais hidrogênio ao longo de todo o atomizador; FIT - radicais hidrogênio possuem localização pontual e não podem ser deslocados (confinados no final do capilar utilizado para a inserção de O_2).²³

É importante destacar que não existe um atomizador ideal e os processos de redução da concentração de átomos no estado fundamental e gasoso no interior do atomizador podem ser de ordem mecânica ou química. O processo mecânico é baseado na expulsão dos átomos no estado fundamental e gasoso do interior do atomizador por ação do fluxo do gás de arraste. Além disso, como os átomos são extremamente instáveis quando não estão em contato com os radicais hidrogênio, o que favorece a ocorrência de reações químicas na redução da quantidade de átomos no estado fundamental, que foi comprovado através de cálculos termodinâmicos para a determinação de As, Se e Sb.^{29b,73} Estas reações são iniciadas imediatamente após os átomos deixarem as regiões com maior densidade de radicais hidrogênio.

O processo de ordem química da redução da concentração dos átomos no estado fundamental ainda não foi totalmente elucidado, mas para a determinação de As e Se é sabido que as condições da superfície do atomizador de quartzo possuem influência significativa nestas reações.^{30,72} Os processos químicos de decaimento do átomo no estado fundamental e gasoso são intensificados, principalmente, com o excesso de átomos no atomizador o que favorece a formação de espécies poliatômicas e partículas que aceleram a taxa de decaimento dos átomos no estado fundamental e gasoso.¹⁶

Devido à baixa resistência a atomização de interferentes e a reduzida faixa linear de calibração do QTA, o atomizador com microchama difusa (MDF do inglês,

miniature diffusion flames) foi empregado para a atomização de procedimentos que aplicavam uma etapa prévia de pré-concentração (Figura 4).

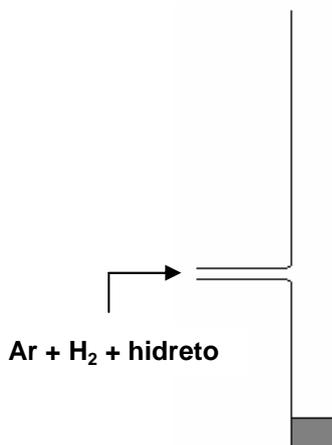


Figura 4. Atomizador com microchama difusa. Adaptado de Dedina.²³

No MDF a maior temperatura é localizada na parte mais externa da chama o que favorece o consumo total de O_2 , e a formação de radicais hidrogênio. Conseqüentemente, todo o volume da chama contém alta densidade de hidrogênio radicalar. Embora a resistência a atomização de interferentes seja maior quando comparado ao QTA, o MDF possui maior ruído e um reduzido tempo de residência dos átomos no caminho óptico.²⁴

O atomizador com chama protegida (FIGS do inglês, *Flame-in-gas-shield atomizer*) (Figura 5) foi inicialmente desenvolvido para o uso na espectrometria de fluorescência atômica (AFS), mas também pode ser utilizado na técnica de AAS. Neste caso, a resistência à interferentes é efetuada pelo controle da distância entre a região de atomização e a região de detecção. Quando comparado ao MDF, este sistema apresenta melhor tolerância à presença de interferentes para a mínima distância entre as regiões de atomização e detecção, além de elevado fluxo de O_2 .²⁴

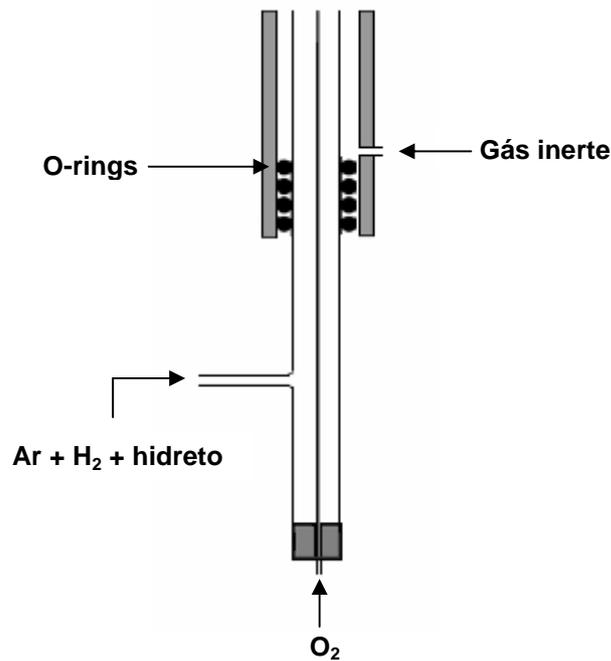


Figura 5. Atomizador com chama protegida. Adaptado de Dedina.²³

Uma rápida comparação do desempenho do MDF e FIGS pode ser efetuada através da avaliação de três parâmetros: (i) produção de radicais hidrogênio, (ii) separação dos átomos no estado fundamental da reação a partir do excesso de O_2 e (iii) diluição do analito no volume do atomizador. Para o MDF todos os parâmetros podem ser controlados pela variação no fluxo da mistura Ar/H_2 . Em contrapartida, o FIGS permite o controle de todos os parâmetros individualmente. Desta forma, a produção de radicais hidrogênio é controlada pelo fluxo de O_2 na microchama, onde os átomos no estado fundamental não reagem com o O_2 pois são protegidos pelo fluxo de argônio e a diluição do analito pode ser controlada pelo fluxo do gás carreador.²³

Assim, para contornar a principal desvantagem do MDF e FIGS relacionada ao reduzido tempo de residência dos átomos no estado fundamental, foi proposto o uso de um novo atomizador em tubo de quartzo com microchamas (MMQTA, do inglês, *multiatomizer*).

2.3.6.1. Multiatomizador (*Multiatomizer – MMQTA*)

Dedina e Matousek²⁷ propuseram um novo atomizador, conforme mostrado na Figura 6. A eficiência de atomização foi avaliada para a determinação de Se, tendo As como interferente, e comparada com o modelo convencional de atomização em tubo de quartzo em forma de T (122 mm de comprimento, 14 mm d.e. e 7 mm d.i.). Com o objetivo de destacar as vantagens do modelo proposto os autores compararam as figuras de mérito, como LOD, sensibilidade e limite de tolerância para interferentes entre os dois atomizadores empregados. Este modelo foi projetado para promover a formação hidrogênio radicalar a partir de microchamas presentes no interior do tubo de quartzo ao longo de toda a extensão do caminho óptico. Desta forma, o tubo principal do atomizador é composto por dois tubos concêntricos (145 mm de comprimento e 6 mm d.i.), onde o tubo mais interno possui orifícios, com cerca de 0,5 mm de d.i., ao longo de sua superfície. Estes orifícios são distribuídos em sete pares ao longo do tubo, sendo que o primeiro par é posicionado no centro e os demais, distribuídos de maneira uniforme e separados por uma distância de 15 mm um do outro. O tubo mais externo não possui orifícios e a cavidade existente entre os dois tubos foi utilizada para introduzir uma mistura de argônio e oxigênio.²⁷

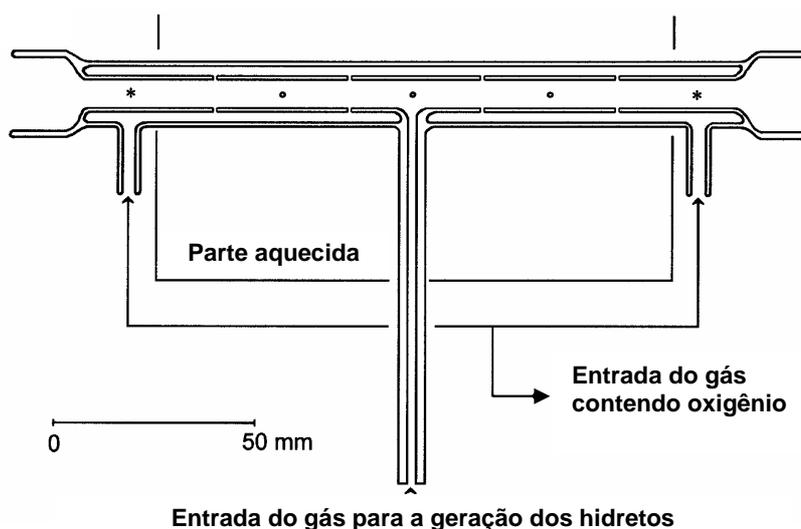


Figura 6. Modelo de atomizador MMQTA. Adaptado de Dedina.²⁷

Os hidretos formados foram introduzidos no atomizador por meio do tubo central (90 mm de comprimento, 5 mm d.e. e 1,8 d.i.), similar as dimensões do QTA, empregado como atomizador convencional. Ambos atomizadores foram aquecidos por meio de uma resistência elétrica a uma temperatura de 900 °C. A determinação de selênio foi efetuada na linha de absorção de 196,0 nm. A sensibilidade do MMQTA foi cerca de 10% superior quando comparada à sensibilidade obtida empregando o QTA. Contudo, os autores destacaram que a principal vantagem do MMQTA está relacionada ao aumento da faixa de calibração.²⁷

Foi verificado que para o QTA, o perfil de calibração é linear até a concentração de 10 ng ml⁻¹ (correspondente a 0,35 de absorbância) e uma tendência a curvatura foi observada para concentrações entre 15 e 20 ng ml⁻¹. Por outro lado, o MMQTA possui faixa de calibração até 12 ng ml⁻¹ (0,5 de absorbância) e apenas com concentrações da ordem de 30 ng ml⁻¹ foi observada tendência à curvatura. Os LODs para MMQTA e QTA foram de 0,019 e 0,014 ng ml⁻¹, respectivamente. Esta pequena diferença nos LODs foi atribuída à diferença de comprimento e espessura dos dois atomizadores. De maneira que, o MMQTA por ser mais longo e mais estreito, atenua com mais intensidade a radiação emitida pela lâmpada de cátodo oco (absorbância de 0,73 para o MMQTA e de 0,33 para o QTA). A tolerância à interferência de As na determinação de Se à uma concentração de 10 ng ml⁻¹ em HCl 1 mol l⁻¹, NaBH₄ 0,5% (m/v) foi na ordem de 0,5 µg ml⁻¹ com o emprego do MMQTA. Porém, este valor foi cerca de 10 vezes menor quando comparado com o QTA. Contudo, o uso do MMQTA possui uma resistência à interferentes de duas ordens de magnitude pior quando comparado ao MDF.²⁵ Os autores descreveram que este fato pode ocorrer em virtude de que nem todo o volume interior do atomizador MMQTA seja ocupado por hidrogênio radicalar e, além disso, a baixa concentração de hidrogênio radicalar nas extremidades do tubo pode promover o rápido decaimento dos átomos no estado fundamental e gasoso.

Matousek *et al.*⁷⁴, propuseram um novo modelo de MMQTA, conforme mostrado na Figura 7, onde os sucessivos ciclos de atomização do analito foram alcançados pela produção de hidrogênio radicalar ao longo de todo o caminho óptico.

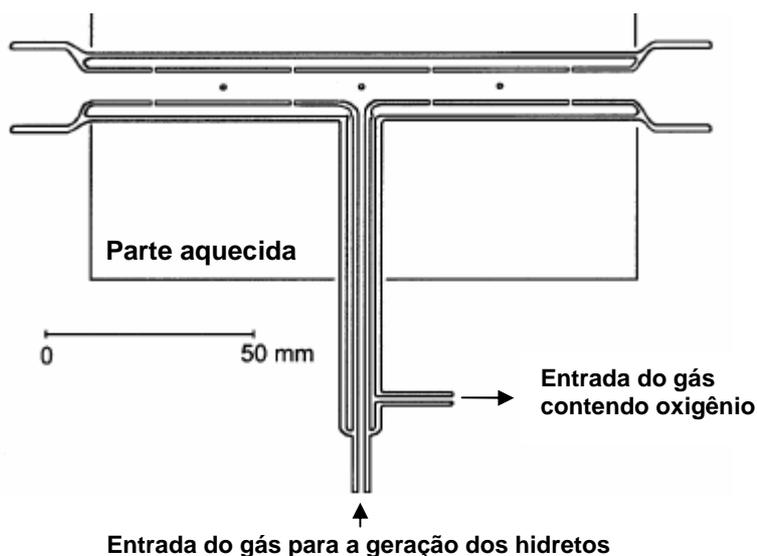


Figura 7. Modelo do novo atomizador MMQTA. Adaptado de Matousek.⁷⁴

O completo preenchimento do tubo central do atomizador por hidrogênio radicalar foi possível utilizando uma mistura de hidrogênio e oxigênio na razão estequiométrica de 3:1, respectivamente, o que corresponde a um pequeno excesso de O_2 . A linearidade das curvas de calibração e a resistência à atomização de interferentes para a determinação de As, Se e Sb foram comparadas entre o novo modelo de atomizador e o atomizador convencional (QTA). A linearidade da curva de calibração foi mantida até uma concentração máxima de 200 ng ml^{-1} para Se e Sb e de 100 ng ml^{-1} para As utilizando o MMQTA. A tolerância à atomização de interferentes foi duas ordens de magnitude superior, quando comparada com o QTA. Desta forma, os limites de tolerância ao interferente foram de 0,7, 1,4, 0,2 e $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ para as interferências de As na determinação de Se, Se na determinação de As, Sb na determinação de Se e Se na determinação de Sb, respectivamente.⁷⁴

Dentre os modelos de atomizadores estudados, a adição de oxigênio pelo canal central do MMQTA produz melhores resultados, visto que a temperatura na região central do atomizador é maior e minimiza a formação de dímeros e espécies poliatômicas que são as principais fontes de ruído quando o gás adicional é injetado em regiões de menor temperatura, como por exemplo, nas extremidades do atomizador. Contudo, os autores verificaram que o ruído no atomizador proposto foi, aproximadamente, 30% superior quando comparado ao QTA. Este fato está relacionado ao fluxo de gás não uniforme no interior do atomizador, decorrente da

diferença de temperatura entre a região central e as extremidades. Adicionalmente, o O₂ possui um perfil de absorção em comprimentos de onda inferiores a 200 nm, principalmente, à elevadas temperaturas. Para minimizar este efeito e facilitar o controle do fluxo de oxigênio, os autores recomendaram o emprego de uma mistura de oxigênio e argônio ou o uso de ar atmosférico. Além disso, foi observado que quantidades excessivas de oxigênio suprimiram o sinal analítico de As e Sb e, com mais intensidade, para o Se. Os autores sugeriram que o O₂ adicionado possui duas funções: a formação de hidrogênio radicalar e o deslocamento dos átomos no estado fundamental e gasoso para regiões mais externas do atomizador e de menor temperatura. Evidências reportam que a produção de hidrogênio radicalar é correspondente a quantidade total de oxigênio, sendo necessária uma molécula de O₂ para a formação de dois radicais hidrogênio.⁷⁴

Flores *et al.*⁴³ investigaram o emprego do MMQTA e QTA para a determinação de antimônio, arsênio, bismuto e selênio na presença de As, Bi, Pb, Sb, Se e Sn como interferentes, empregando a técnica de geração de hidretos em batelada. As condições operacionais otimizadas foram as mesmas para os dois atomizadores empregados. Contudo, para o MMQTA foi necessária a otimização do fluxo de ar utilizado como gás auxiliar. Segundo os autores, valores superiores a 20 ml min⁻¹ causaram uma redução significativa do sinal analítico de As e Se. Porém, para Bi e Sb a redução do sinal analítico somente foi observada quando o fluxo de ar foi superior a 50 ml min⁻¹. Desta forma, para os estudos posteriores os autores empregaram um fluxo de ar de 20 ml min⁻¹ como condição de compromisso para todos os analitos estudados. Foi verificado, que a faixa linear de calibração foi estendida, significativamente, com o uso do MMQTA (mais de 60%) para a determinação de As, Sb e Se. Contudo, para a determinação de Bi não houve extensão da faixa linear de calibração quando o MMQTA foi empregado.

Os autores verificaram que interferências durante a etapa de atomização são fortemente correlacionadas ao mecanismo de atomização e a redução dos átomos no estado fundamental ao longo de todo o caminho óptico. Como anteriormente mencionado, o MMQTA possui maior resistência a ação de interferentes. Contudo, os autores verificaram interferência em fase líquida de Bi na determinação de Sb, conforme já descrito na literatura.¹²⁵ Ademais, As, Sb, Se e Sn interferem na determinação de As, Sb e Se somente em fase gasosa. Em alguns casos, a interferência pode ocorrer em ambas as fases como por exemplo, Bi na

determinação de As e Se. A interferência causada pelo Bi pode ser devido a formação de Bi elementar, principalmente em quantidades superiores a 100 µg, o que é evidenciado pela formação de um precipitado preto no frasco de reação.¹²

2.3.6.2. Uso da geração de hidretos para determinação de arsênio

O procedimento de geração de hidretos associado as mais diversas técnicas de detecção tem sido amplamente empregado para a determinação de arsênio, principalmente, por proporcionar melhores limites de detecção. Entretanto, a técnica de HG pode ser susceptível a erros de diversas magnitudes. As maiores fontes de erros serão destacadas a seguir:

- (i) na etapa de preparo de amostras podem ocorrer perdas por volatilização, contaminação, mudanças no estado de oxidação e incompleta decomposição de espécies metiladas de As, por exemplo, arsenobetaina;³⁶
- (ii) o sinal analítico pode ser modificado significativamente devido ao estado de oxidação e forma de ligação do elemento à matriz. Assim, uma etapa prévia de pré-redução pode ser empregada tornando o procedimento moroso e, adicionalmente, esta etapa pode não ser eficiente;
- (iii) a presença de interferentes.^{29d}

Estudos da cinética de geração de arsina, por exemplo, demonstram que o hidreto volátil é produzido muito rapidamente a partir de compostos de As(III) e mais lentamente a partir de compostos de As(V). Além disso, a arsina possui uma elevada solubilidade em água, mesmo em elevadas temperaturas. Obviamente, o efeito do comprimento da alça de reação, concentração do redutor (NaBH₄) e pH da solução em sistemas de fluxo contínuo (CF) ou de injeção em fluxo (FI) afeta a conversão das espécies de As(V) em arsina. O uso de alças de reação maiores pode trazer alguns inconvenientes, principalmente, maior risco de interferências em fase líquida.^{29d} Na literatura são apresentados diversos estudos onde os efeitos da cinética de liberação do hidreto gerado a partir de As(III) e As(V) podem ser explicados.^{56,100} Alguns autores salientam que a taxa de conversão do As(V) à arsina

em pH elevado é mais lenta em comparação com a conversão do As(III), em função de uma maior dificuldade de transferência do hidrogênio para o As pelo maior número de ligantes.¹⁴ Entretanto, outros autores⁵⁶ afirmam que a cinética de conversão do As(V) à arsina é mais lenta devido a etapa inicial de pré-redução do As(V) à As(III), onde somente na etapa seguinte ocorre a geração da arsina.

2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

Atualmente, a determinação total da quantidade de um dado elemento é importante, no entanto, em muitos casos, não é suficiente para a compreensão de sua toxicidade e biodisponibilidade. Informações relativas às concentrações de espécies individuais em diferentes estados de oxidação e/ou diferentes formas orgânicas são particularmente necessárias para a análise de especiação. A identificação de diferentes formas químicas de um elemento envolve duas técnicas complementares. A primeira promove uma separação eficiente e segura, enquanto que a outra promove uma detecção e quantificação adequada. Como a maioria dos metais está presente na forma iônica ou polar na matriz da amostra, a determinação direta destas espécies é limitada. Contudo, procedimentos que convergem às espécies de interesse em compostos voláteis e termodinamicamente estáveis podem ser utilizados. Neste sentido, a técnica de geração de hidretos tem sido aplicada juntamente a outras técnicas de detecção para a análise de especiação.⁹

A toxicidade e a biodisponibilidade dos compostos de arsênio é extremamente dependente das espécies formadas. Desta forma, nos últimos anos vários estudos vêm sendo feitos utilizando técnicas de especiação de arsênio com o objetivo de identificar e quantificar diferentes espécies, em diversas matrizes.

2.4.1. Preparo de amostras e estabilidade das espécies de arsênio

Para a determinação da concentração total de um elemento em uma amostra, é necessário efetuar a completa destruição da matriz. Por outro lado, para a análise de especiação, as espécies químicas do elemento devem ser extraídas da amostra de forma quantitativa e, principalmente, de forma a evitar sua destruição e/ou

conversão.^{3,47} Desta forma, a etapa de preparo das amostras é crucial na análise de especiação química. Com relação ao preparo de amostras para a análise de especiação de arsênio, geralmente, são utilizadas técnicas de extração, onde o meio extrator escolhido deve atender alguns requisitos, como:⁴⁷

- Interagir completamente com a amostra;
- Solubilizar todos os compostos de arsênio;
- Não modificar as espécies químicas;
- Deve ser compatível com as técnicas analíticas de separação e detecção.

Para análise de especiação de As em amostras biológicas, os meios extratores mais utilizados são a água e a mistura de água e metanol e para os compostos apolares de As, os meios mais utilizados são acetona e clorofórmio. Além disso, alguns procedimentos podem ser adotados, juntamente, com a etapa de extração para aumentar seu rendimento, como agitação mecânica e sonicação.^{3,47,106}

Recentemente, foi descrito na literatura um processo de extração de espécies de As, utilizando água como meio extrator, seguido de aquecimento por radiação micro-ondas. Neste trabalho, uma alíquota de 100 mg de origem marinha (tecido de ostra, peixe, camarão e alga) foi misturada com água e submetida ao aquecimento por radiação micro-ondas por 10 min, a 50 W, em sistema fechado ou sob irradiação ultrassom por 10 min (somente para alga). Após, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 min, o sobrenadante foi filtrado e refrigerado a 4 °C. Utilizando ambos métodos de extração, foram obtidos resultados satisfatórios.⁵⁴

A extração de compostos de As é, comumente, feita utilizando uma mistura de água e metanol como meio extrator.⁹⁹ Neste sentido, Lindemann *et al.*⁶⁹ estudaram a estabilidade das espécies As(III), As(V), AsB, MMA(V), DMA(V), ácido fenilarsônico (PAA), sob várias condições de armazenamento, em amostras de água, urina, tecido de peixe e solos, utilizando a técnica de HPLC acoplada à ICP-MS.⁶⁸ O armazenamento das amostras foi feito sob refrigeração a -20, + 3 e +20 °C, em frascos de polipropileno, ao abrigo da luz e o volume dos frascos foi completado até a superfície para evitar contato com o ar. Os autores observaram que, para as amostras de água, o armazenamento a -20 °C apresentou uma perda significativa de As(III) após 30 dias, enquanto que a 3 e 20 °C, foram obtidas recuperações

quantitativas desta espécie. A amostra de urina foi submetida a uma etapa de pré-tratamento, onde esta foi filtrada utilizando membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 μm e posterior diluição com água. Para amostra de urina, foram obtidas recuperações quantitativas após 5 dias de armazenamento a 3 °C, enquanto que para as amostras de peixe e solo, este tempo foi reduzido para 3 dias para garantir a estabilidade das espécies.

O preparo da amostra de peixe foi feito para, aproximadamente, 1 g de amostra, onde consistiu em uma etapa de extração com uma mistura de água e metanol (1:1), em banho de ultrassom por 20 min, seguida de uma etapa de centrifugação a 5400 rpm por 25 min. Este procedimento foi repetido três vezes e após, os sobrenadantes foram recolhidos e evaporados à secura, onde o resíduo resultante foi dissolvido em 10 ml de água e filtrado em membrana de PTFE 0,45 μm . Para a amostra de solo, foi aplicado um procedimento semelhante, entretanto, utilizando 3 ml de água para extração. Foi observado que, quando uma solução de referência de As foi adicionada às amostras de peixe e solo, previamente ao procedimento de extração, foram obtidas recuperações quantitativas para espécies de As no tecido de peixe, enquanto que para a amostra de solo, as recuperações foram inferiores a 40 e 70% para As(III) e As(V), respectivamente. Os autores concluíram que a extração quantitativa das espécies de As em amostras sólidas ainda pode ser considerada com o “calcanhar de *Aquiles*” na análise de especiação.⁶⁹

Em outro trabalho, foi feito um estudo da estabilidade de As(V), MMA(III), DMA(III), AsB e arsenocolina (AsC) em água e urina e a determinação das espécies foi feita por LC-HG-AAS. A amostra de urina (2 ml) foi filtrada e misturada com etanol (20 ml). A mistura resultante foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min a -15 °C. O procedimento foi repetido, utilizando 5 ml de etanol e, posteriormente, o etanol foi removido por evaporação a 40 °C. O armazenamento das amostras foi estudado sob abrigo da luz, refrigeração a -20, 4 °C e a temperatura ambiente em frascos de polipropileno e Pyrex[®] e sem adição de reagentes estabilizantes. Para a amostra de água, foi observado que as espécies As(V) e MMA(III) não foram perdidas ou transformadas sob armazenagem a temperatura ambiente e a 4 °C, mesmo após 67 dias. A concentração da espécie DMA(III) foi aumentada após 30 dias de armazenagem a 4 °C e após 1 dia a temperatura ambiente. Os autores concluíram que, possivelmente, ocorreu a transformação de outras espécies de As na espécie

DMA(III). Por outro lado, a concentração da espécie AsC foi diminuída sob armazenagem a temperatura ambiente e a 4 °C, podendo ter ocorrido conversão para DMA(III) ou adsorção nas paredes do recipiente. A espécie de AsB foi, relativamente, estável, a 4 °C e perdas de 20% foram observadas somente após 67 dias.⁹⁴

Com relação a amostra de urina, os autores salientaram que, devido à sua composição e propriedades físico-químicas, é provável que ocorra transformação das espécies de As neste meio. Desta forma, para investigação da estabilidade das espécies de As neste meio, foi feita uma adição dos analitos na amostra. Quando a amostra foi mantida a -20 e 4 °C, não ocorreu nenhuma transformação das espécies, mesmo após 67 dias, com exceção da AsC e As(III), onde ocorreu uma redução na concentração quando a amostra foi armazenada a 4 °C. Como este efeito ocorreu, simultaneamente, com o aumento na concentração de AsB e As(V), os autores sugeriram que poderia estar ocorrendo a conversão da AsC para AsB e do As(III) para As(V), por oxidação.⁹⁴

A estabilidade de espécies trivalentes de As (DMA e MMA) em amostras de urina, também foi investigada por Gong *et al.*⁴⁸ A estabilidade das espécies foi avaliada em função da temperatura (25, 4 e -20 °C) e tempo (até 5 meses) de armazenamento e a identificação e quantificação das espécies foi feita por HPLC-HG AFS. Foi observado que a oxidação das espécies DMA(III) e MMA(III) foi, significativamente, dependente da matriz e temperatura de armazenamento, onde, aproximadamente, 90% da espécie MMA(III) foi oxidada à MMA(V), sob refrigeração a 4 e -20 °C, após um período de 5 meses. Além disso, na temperatura de 25 °C, a oxidação à MMA(V) foi completa após 1 semana. Com relação a espécie DMA(III), esta foi, completamente, oxidada à DMA(V) após 1 dia a 4 e -20 °C, enquanto que sob armazenamento a 25 °C, a oxidação foi completa após 17 h.

Pizarro *et al.*⁹⁹ avaliaram diferentes tipos de meios extratores para posterior especiação de As (As(III), As(V), DMA(V) e MMA(V)) por HPLC-ICP-MS, em amostras ambientais (arroz e solo) e biológicas (tecido de peixe e frango). Os estudos foram feitos empregando metanol e água em diferentes proporções (1:1, 9:1 e uso das duas condições sequencialmente). A extração das espécies de As nas amostras de peixe e frango foi feita utilizando, aproximadamente, 1 g de amostra e 10 ml do meio extrator. A mistura foi mantida em repouso por 10 h a 55 °C e, posteriormente, foi aplicada uma etapa de sonicação por 5 min e centrifugação por

15 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi removido, evaporado até *secura* e diluído com água. Este procedimento foi aplicado para todos os meios extratores utilizados e, posteriormente, foi feita uma etapa de filtração e as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C. Foi observado que a eficiência de extração de As total para a amostra de frango e peixe foi entre 42 a 60% e 53 a 58%, respectivamente, utilizando somente água. Com o uso de metanol e água (1:1 e 9:1), foram obtidas recuperações na faixa de 70 a 75% e 90%, para as amostras de frango e peixe, respectivamente. Os estudos de especiação mostraram que três espécies de As foram encontradas na amostra de frango, AsB, DMA e uma espécie não identificada com tempo de eluição inferior à AsB, utilizando uma coluna de troca aniônica. Quando foi utilizada uma coluna de troca catiônica foi observada a formação de dois sinais: um deles referente à espécie de AsB e outro da espécie DMA mais a espécie não identificada. Utilizando três etapas sucessivas de extração, foram obtidas recuperações superiores a 97%, utilizando todos os meios extratores investigados. Os resultados obtidos para a amostra de peixe, foram similares.

Alguns trabalhos na literatura relatam que as soluções de referência de As(III) e As(V), preparadas a partir de NaAsO_2 e $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, podem ser armazenadas sob refrigeração a 4 °C, sem ocorrer o processo de conversão das espécies.⁴⁷ No entanto, alguns autores reportam na literatura que, quando soluções de referência de arsênio em baixas concentrações (até $5 \mu\text{g l}^{-1}$), são preparadas em meio aquoso e armazenadas em recipientes de polipropileno, ocorre a completa conversão das espécies. Os autores salientaram que este fenômeno era mais pronunciado em baixas concentrações e mesmo, quando as soluções de referência eram preparadas nas mesmas condições, este efeito poderia não ocorrer, evidenciando que a determinação da concentração exata das espécies exige uma série de cuidados.⁴⁷

Recentemente, foi feito um estudo de especiação de compostos de arsênio (As(III), As(V), DMA(III), DMA(V), MMA(III), MMA(V), arsino-glutathiona $\text{As}(\text{GS})_3$, monometilarsino-glutathiona $\text{MMA}(\text{GS})_2$ e dimetilarsino-glutathiona $\text{DMA}(\text{GS})$), utilizando cromatografia de troca catiônica e de fase reversa acoplada à ICP-MS e espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI) para identificação molecular das espécies de arsênio. Neste trabalho, foi feito um estudo da estabilidade das espécies de arsênio em função do pH e do tempo de meia-vida. As soluções dos compostos de arsênio (mencionados acima) foram preparadas à temperatura ambiente, em uma solução tampão de fosfato pH 7,4, em diferentes pH

(2,0, 4,3, 6,0, 7,4 e 8,4), utilizando soluções de NH_4OH ou HNO_3 para o ajuste do pH. As análises por HPLC-ICP-MS foram feitas imediatamente após o preparo das soluções e após intervalos de tempo entre 15 e 45 min para estimar o tempo de meia-vida dos complexos de arsênio-glutationa. Quando o pH foi avaliado entre 2,0 e 8,4 foi observado que as espécies de As(III) e MMA(III) não sofreram modificação e foi encontrada uma abundância de, aproximadamente, 100%, mostrando que estas espécies possuem uma elevada estabilidade. Ainda, foi observado que espécie de As(III) possui elevada estabilidade, mesmo em soluções não-degaseificadas. Entretanto, a abundância da espécie DMA(III) foi de, aproximadamente, 55%, mesmo após a análise imediata desta solução, evidenciando a instabilidade desta mesmo após purga com argônio, e em diferentes valores de pH.¹³²

Com relação aos complexos de As com glutatona, $\text{As}(\text{GS})_3$ foi mais estável em pH 2,0, enquanto que $\text{MMA}(\text{GS})_2$ e $\text{DMA}(\text{GS})$ apresentaram maior estabilidade em pH 4,3. Adicionalmente, foi observado que estas espécies são muito instáveis em condições próximas à neutralidade e alcalinas. Os autores também estudaram o tempo de meia-vida dos complexos de arsênio, onde foi verificado que o complexo de $\text{DMA}(\text{GS})$ possuiu o maior tempo de meia-vida em comparação com os outros complexos avaliados, sendo de 55 min, em pH 2,0. Já em condições neutras ou levemente alcalinas, o tempo de meia-vida foi modificado para valores entre 23 e 37 min.¹³² Os autores salientaram que isto poderia ser a razão pela qual este complexo de arsênio tem sido sugerido como potencial fármaco anti-leucêmico de acordo com estudos mostrados na literatura.¹²³ O complexo de $\text{As}(\text{GS})_3$ apresentou menor estabilidade, com um tempo de meia-vida de 35 min em pH 2 e inferior a 6 min, em pH 6 ou superior. O tempo de meia-vida do complexo $\text{MMA}(\text{GS})_2$ foi de 37 min em pH 2 e inferior a 6 min em pH 8,4. Este comportamento foi o inverso ao observado para as espécies trivalentes, onde As(III) apresentou a maior estabilidade, enquanto que MMA(III) possui uma estabilidade maior quando a solução foi preparada em água livre de O_2 em comparação com DMA(III).¹³²

Para análise de especiação de compostos de As, alternativas de preparo de amostras têm sido utilizadas com o objetivo de preservar as espécies, como por exemplo, a técnica de digestão enzimática^{101,106} e em meio alcalino¹³⁰. Rattanachongkiat *et al.*¹⁰¹ utilizaram a digestão com tripsina para análise de especiação de As, onde 0,25 g de tecido de peixe e crustáceo e 1 g de tripsina

foram homogeneizadas e misturadas com 20 ml de NH_4HCO_3 $0,1 \text{ mol l}^{-1}$. Posteriormente, a mistura permaneceu em contato por 12 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, foi centrifugada a 2000 rpm por 20 min e armazenada sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior determinação das espécies As(III), As(V), AsB, DMA, MMA. Em outro trabalho,¹³⁰ amostras biológicas foram tratadas com NaOH 4 mol l^{-1} a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h, para posterior determinação de As(III), DMA(III), MMA(III), ácido trimetilarsínico, onde foram obtidas recuperações na ordem de 80 a 103% para todas as espécies.

É importante destacar que grande parte dos trabalhos encontrados na literatura abrange o estudo da estabilidade e preparo de amostras de espécies de As em amostras ambientais, principalmente, em água. Poucos estudos são feitos com relação a estabilidade e ao preparo de amostras para especiação de As em amostras biológicas e nenhum trabalho foi encontrado na literatura em amostras de fármacos. Foi observado nos trabalhos encontrados na literatura que a etapa de preparo de amostras pode ser morosa, uma grande quantidade de reagentes pode ser utilizada, o que por sua vez, pode afetar a estabilidade das espécies. Ainda, com relação ao preparo de amostras, é sabido que, juntamente com o armazenamento, esta etapa constitui-se como a mais susceptível em relação aos erros associados à análise de especiação. Ainda, é necessário desenvolver procedimentos de preparo de amostras para análise de especiação que exijam menor tempo de execução, maior eficiência e garantia de preservação das espécies.

2.4.1.1. Introdução de amostra na forma de suspensão

A técnica de HG acoplada às técnicas espectrométricas, geralmente, exige que seja aplicada uma etapa de pré-tratamento da amostra, conforme foi observado anteriormente, onde as técnicas de decomposição e/ou extração estão entre as mais utilizadas. Entretanto, é extensamente discutido na literatura, que a etapa de decomposição e/ou dissolução da matriz da amostra, aumenta o tempo de execução da análise e o risco de perdas do analito ou contaminação.¹⁰⁹ Neste sentido, com o objetivo de contornar estas limitações, a introdução direta de amostra na forma de suspensão tem sido utilizada na análise de especiação de As.⁷⁸

Recentemente, a técnica de amostragem de suspensões acoplada às técnicas de AAS com atomização eletrotérmica e chama, tem sido amplamente

utilizada com o objetivo de simplificar a etapa de preparo de amostras e evitar alguns inconvenientes associados ao uso da decomposição por via seca ou via úmida. A introdução da amostra na forma de suspensão combina as vantagens associadas à análise direta de sólidos, como redução do tempo de preparo de amostra, minimização de perdas de analito e contaminação, redução dos brancos analíticos, e análise de amostras líquidas, como facilidade de dispersão da amostra, facilidade de automação e utilização dos mesmos atomizadores usados para amostras líquidas.^{5,76} Desta forma, a análise de suspensões tem sido aplicada em associação com a técnica de HG, como uma alternativa promissora, com o objetivo de evitar um tratamento intensivo da amostra, como por exemplo, decomposição utilizando ácidos concentrados.

Um dos fatores críticos na análise por suspensão é manter a estabilidade da suspensão durante a etapa da introdução da amostra e baixa reprodutibilidade. Assim, a etapa de homogeneização da suspensão é crucial e algumas alternativas têm sido utilizadas, como uso de agentes estabilizadores, agitação magnética e com ultrassom, pré-digestão da suspensão, entre outras. Outro fator preponderante na análise por suspensão é o tamanho de partícula, que por sua vez, influencia de forma significativa na precisão e exatidão.^{5,10,61} Desta forma, a eficiência da amostragem por suspensão depende de alguns fatores, onde cabe destacar:⁵

- Homogeneidade da amostra;
- Cominuição e seleção do tamanho de partícula;
- Preparo da suspensão;
- Meio líquido utilizado como dispersante e alguns componentes auxiliares, como anti-espumante, modificadores químicos, agentes umectantes, entre outros;
- Homogeneização da suspensão;
- Uso de agentes estabilizantes;
- Extração do analito para o meio;
- pH do meio e homogeneização para completa extração do analito;
- Influência do tamanho de partícula na sedimentação da suspensão e na etapa de atomização;
- Concentração da suspensão;

- Eficiência de atomização e possibilidade de utilizar soluções de referência para a etapa de calibração.

Com relação ao uso da amostragem por suspensões associada à HG AAS, esta é baseada na extração do analito em fase líquida de forma eficiente. Embora o princípio seja entendido facilmente, o mecanismo de ação do agente redutor no interior das partículas sólidas, onde se encontra o analito, ainda não é entendido claramente. Uma das possíveis explicações é que o analito encontra-se adsorvido nas partículas sólidas e participa da reação de formação do hidreto.⁷⁶

O primeiro trabalho utilizando a amostragem de suspensão acoplada à técnica de HG AAS foi feito por Haswell *et al.*⁵², onde foi feita a determinação de As em amostras ambientais. Foi empregado um procedimento para extração do analito da amostra: extração à quente e à frio utilizando suspensão. Para formação da suspensão, a amostra de solo foi pesada diretamente no frasco utilizado para a geração dos hidretos, foi feita a adição de 10 ml de HCl 4 mol l⁻¹ e a mistura foi mantida sob agitação magnética. Posteriormente, foi feita a adição de NaBH₄ 1% (m/v) para geração dos hidretos. Os autores observaram que, quando concentrações maiores de NaBH₄ foram utilizadas, ocorreu dificuldade de solubilização, enquanto que em concentrações mais baixas, mesmo 1%, ocorria uma precipitação, exigindo que este reagente fosse filtrado, previamente à análise. Além disso, o volume de NaBH₄ 1% (m/v) foi investigado de 1 a 8 ml, onde foi utilizado 1 ml, visto que nesta condição foram observados maiores sinais de absorvância e menores valores para os brancos. Os autores também investigaram a influência do tamanho de partícula, nas seguintes faixas: 125 a 90, 90 a 63, 63 a 53 e 53 a 45 µm. Foi verificado que recuperações na ordem de 60% foram obtidas utilizando amostragem por suspensão, independente do tamanho de partícula utilizada. Conforme esperado, o RSD foi inferior para as amostras com menor tamanho de partícula, onde o RSD variou de 4 a 12,5%.

Utilizando a amostragem de suspensões acoplada à ET AAS, Santos *et al.*¹⁰⁵ determinaram a concentração de As total em material biológico de origem marinha. As amostras foram homogeneizadas com o uso de um liquidificador, secas a 40 °C por dois dias e cominuídas por 5 min, com auxílio de um misturador automático. Aproximadamente, 10 mg de amostra (tamanho de partícula ≤ 100 µm) foram pesadas diretamente no frasco do amostrador automático do equipamento. Em

seguida, foi feita a adição de HNO_3 3% (v/v) e Triton como agente dispersante. A mistura foi submetida a irradiação com ultrassom, utilizando uma sonda 20 kHz, 100 W e 20% da amplitude. Para otimização do procedimento do preparo da suspensão, foi utilizada análise multivariada, onde diferentes variáveis foram investigadas, como: concentração de HNO_3 , concentração de Triton X-100, amplitude de ultrassom, tempo de sonicação e massa de amostra. Foi observado que a única variável que apresentou efeito significativo na amostragem por suspensão, foi a massa de amostra utilizada, evidenciando que a concentração da suspensão é um dos fatores mais importantes que deve ser otimizado. Adicionalmente, foi feita uma etapa de extração do analito, utilizando banho de ultrassom, por 3 min a 40% da amplitude. O limite de detecção e massa característica para As, utilizando amostragem por suspensão acoplada à ET AAS, foram de $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e 28,6 pg, respectivamente.

Em outro trabalho, a amostragem de suspensão acoplada à HG e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES) foi utilizada para determinação de As, Sb, Se e Sn em amostras biológicas e ambientais. A suspensão da amostra biológica (hepatopancreas de lagosta) foi preparada a partir da dissolução de 300 mg de amostra em 9 ml de HCl 10% (v/v) e 1 ml de tiouréia 10% (m/v) (usada para etapa de pré-redução) para que a suspensão ficasse com concentração final de até 3,6% (m/v). Posteriormente, a suspensão foi homogeneizada com o uso de ultrassom (20 kHz, 70 W) por 90 s a 60% de amplitude. Durante a análise, foi observada a formação de espuma no separador gás-líquido, sendo necessário efetuar a adição de um anti-espumante. Desta forma, previamente à análise, foi feita a adição de 100 μl de decanol à suspensão. Os autores também destacaram que, apesar da técnica de amostragem em suspensão minimizar problemas de contaminação da amostra por evitar o uso da decomposição da amostra, os valores de branco foram significativos, principalmente, devido aos reagentes, em especial ao NaOH e NaBH_4 . Na etapa de geração dos hidretos, foram investigados o tempo de pré-redução, influência da concentração de HCl, NaBH_4 e o fluxo do gás carreador. As melhores condições foram obtidas utilizando um tempo de pré-redução de 30 min, NaBH_4 1,5% (m/v) estabilizado com NaOH 0,1% (m/v), concentração de HCl de 10% (v/v) e fluxo do gás carreador (He) de 400 ml min^{-1} . O LOD para As foi de $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$.⁷⁸

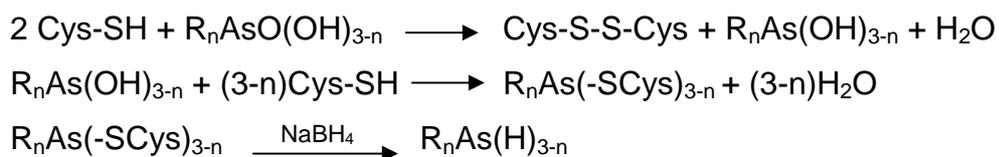
Foi observado que poucos trabalhos na literatura relatam a determinação de As utilizando amostragem direta de suspensão acoplada à HG AAS para amostras

biológicas. Grande parte destes utilizam amostragem de suspensões acoplada à HG AAS para determinação de outros elementos, como Pb, Hg e Cd. São descritos alguns trabalhos para determinação de As, principalmente, em amostras ambientais utilizando HG acoplada à diferentes técnicas, como AAS^{51,85,118}, espectrometria de fluorescência atômica⁸, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica^{89,121}, GF AAS^{77,124} e à ICP-MS^{11,102}. Cabe destacar que nestes trabalhos é feita a determinação de As total na amostra, de forma que não foram encontrados trabalhos na literatura que abordam a análise de especiação de As utilizando amostragem por suspensões e HG AAS em amostras biológicas.

2.4.2. Geração de hidretos aplicada à análise de especiação

Nos últimos anos, a técnica de HG AAS, juntamente com técnicas cromatográficas, tem sido empregada para análise de especiação de As, apresentando elevada sensibilidade, exatidão, rapidez e custo relativamente baixo, principalmente quando associada às técnicas espectrométricas.

Howard e Salou⁵⁷ investigaram o efeito da ação de agentes complexantes a base de enxofre, como por exemplo, L-cisteína, 2,3-dimercapto-1-propanol, 2-mercaptoetanol, 3-mercapto ácido propriônico, ácido tioglicólico e diocarbamato de sódio na determinação de iAs, MMA e DMA empregando a etapa de aprisionamento criogênico com posterior detecção por HG AAS. Os agentes complexantes investigados foram adicionados às soluções referência 20 minutos antes da análise a temperatura ambiente. Dentre os agentes complexantes testados, o ácido tioglicólico apresentou resultados considerados comparáveis com aqueles empregando L-cisteína, no entanto, os demais complexantes não produziram acréscimo do sinal analítico obtido para a determinação de As. Para a adição de ácido tioglicólico 5% (v/v) foi verificado a redução das espécies de As em menos de 1 minuto enquanto que, para o uso de L-cisteína 2% (m/v) a redução do iAs(V) ou DMA(V) não foi imediata. Contudo, os autores não puderam precisar se o ácido tioglicólico possui ação de minimizar interferências, porém, foi evidente que este complexante foi mais efetivo na redução de todas as espécies de As, conforme proposto por Howard, através das reações abaixo.⁵⁶



Em contrapartida, o uso deste complexante é indicado para procedimentos em fluxo visto que, para procedimentos em batelada a cinética de reação da L-cisteína foi mais rápida e a elevada toxicidade do ácido tioglicólico não compensa o seu uso. Porém, os efeitos obtidos para o uso da L-cisteína em outros trabalhos são bem definidos.^{58,119} A adição de L-cisteína promove a igualdade de sensibilidade entre as diferentes espécies de As, minimiza a ação de interferentes como metais de transição e reduz a concentração ácida necessária para a redução com NaBH₄. Cabe destacar, que este último efeito é particularmente importante pois a redução da concentração ácida reduz os valores dos brancos analíticos o que possibilita a determinação de As em concentrações muito baixas.

Em outro trabalho, foi desenvolvido um método para a determinação de ácido monometilarsônico por reação com NaBH₄. A metilarsina gerada foi coletada em nitrogênio líquido, re-volatilizada e conduzida até uma cela de quartzo com posterior determinação por espectrometria de absorção molecular em fase gasosa. O espectro obtido sob ampla faixa de comprimentos de onda permitiu o uso de calibração multivariada com o emprego de ferramentas quimiométricas. O método foi aplicado para a determinação de MMA em amostras de água e o limite de detecção alcançado foi de 2,8 ng ml⁻¹. Os autores avaliaram a influência de determinadas espécies no sinal analítico para a determinação de MMA. A maioria das espécies avaliadas não interferem em concentrações de até 200 µg ml⁻¹. Contudo, supressão do sinal analítico foi observada para a presença de Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Ag(II) e F. Contrariamente, para elementos que formam hidretos voláteis como, Se (IV), Sb(III), Sb(V), Sn(II), As(III) e As(V) o sinal analítico aumenta quantitativamente, o que pode ser útil na determinação simultânea de misturas de vários elementos. Adicionalmente, nitrato e sulfato não interferem no sinal analítico até uma concentração de 1000 µg ml⁻¹, enquanto que nitrito e sulfito produzem intensa supressão do sinal devido a formação de espécies voláteis de NO₂ e H₂S, respectivamente. Melhores resultados foram obtidos empregando o método de calibração multivariada por PLSR quando comparado ao método de calibração univariada.¹⁰⁷

Tian *et al.*¹¹⁷ desenvolveram um método para a especiação de As empregando a cromatografia a líquido como técnica de separação e determinação por HG AAS em amostras de alga marinha. As amostras foram previamente digeridas com HNO₃ concentrado e aquecidas em um bloco digestor por 3 horas com temperatura inferior 100 °C. Extração com água assistida por ultrassom foi efetuada para comparação dos resultados com o método de digestão. A eficiência da geração das espécies voláteis foi avaliada e 4 modelos de condensadores gás-líquido foram empregados para esta finalidade. Foi verificado que a adição do fluxo de Ar diretamente no GLS limita a flutuação do gás carreador e garante menor oscilação dos sinais analíticos, bem como melhor precisão. Adicionalmente, o menor volume interno do GLS reduz a dispersão dos hidretos voláteis e minimiza os efeitos de alargamento do sinal. Dentre a faixa de concentrações de NaBH₄ avaliada de 0,5 a 3,0%, pode ser observado que concentrações superiores a 1,0% provocaram redução e maior flutuação do sinal analítico.

O efeito da concentração ácida (HCl 0,2 a 6,0 mol l⁻¹) foi investigado e a partir de concentrações superiores a 0,6 mol l⁻¹ ocorreu redução significativa na intensidade do sinal para as espécies de DMA e TMAO. Este fato foi atribuído a protonação das espécies metiladas produzindo espécies ácidas de maior solubilidade em equilíbrio com as espécies voláteis geradas. Enquanto, que para as espécies de iAs(III), iAs(V) e MMA a concentração de HCl 6,0 mol l⁻¹ resultou no aumento da intensidade do sinal analítico. Desta forma, os autores propuseram a análise de especiação de iAs(III), iAs(V), MMA, DMA e TMAO empregando o procedimento de HG com gradiente da concentração ácida. A eficiência da geração das espécies foi melhor a uma temperatura de 60 °C. Os resultados obtidos empregando água para extração assistida por ultrassom foram cerca de 20% inferiores quando comparados à digestão em meio ácido para a determinação de As total por GF AAS. Contudo, o somatório total da concentração das espécies de As não apresentou diferença significativa quando comparado com os valores obtidos para a determinação total de As por GF AAS utilizando extração com água assistida por ultrassom. Adicionalmente, o método de adição de analito foi empregado para a validação do procedimento proposto e as recuperações foram superiores a 97% para todas as espécies. Os Limites de detecção para iAs(III), iAs(V), MMA, DMA, TMAO foram de 1,4; 0,9; 1,4; 1,6; 1,5 µg l⁻¹, respectivamente.¹¹⁷

A análise de especiação de compostos de arsênio em amostras biológicas, utilizando um sistema automatizado, foi proposta por Matousek *et al.*⁷⁵ Inicialmente, as espécies de arsênio foram pré-concentradas e separadas em um tubo de vidro na forma de “U” preenchido com uma fase estacionária (chromosorb) e revestido externamente por um filamento. As espécies de As voláteis, geradas a partir da reação com NaBH₄, foram retidas sob resfriamento do tubo em nitrogênio líquido e, posteriormente, volatilizadas por aquecimento gradual do filamento. Sendo então, separadas de acordo com seu ponto de ebulição e propriedades cromatográficas. Após, as espécies foram detectadas por espectrometria de absorção atômica. Quando comparado aos procedimentos de análise de especiação empregando separação cromatográfica e detecção por ICP-MS ou HG-AFS, os autores destacaram que o procedimento proposto necessita de uma mínima etapa de pré-tratamento da amostra. Considerando o fato de que as espécies como MMA(III) e DMA(III) são oxidadas rapidamente para MMA(V) e DMA(V), respectivamente, mesmo em temperaturas inferiores 0 °C. Além disso, a análise de especiação empregando a HG-CT-AAS é, relativamente, de menor custo quando comparada a outras técnicas de especiação e não utiliza procedimentos de extração, geralmente, empregados para efetuar a quebra das espécies de As ligadas as proteínas.

A análise de especiação de As empregando HG-CT-AAS exigiu duas etapas independentes. Na primeira, as espécies de iAs, MMA, DMA, TMAO(V) foram retidas e separadas indiferentemente do estado de oxidação. Na segunda etapa, as espécies foram diferenciadas de acordo com seu estado de oxidação por reação seletiva com NaBH₄. A eficiência de formação da arsina (AsH₃) é baseada no pH da solução. Em pH ácido, próximo a 1, ambas as espécies de As (trivalentes e pentavalentes) possuem cinética favorável para a reação com NaBH₄ e formação da respectiva arsina. Contudo, em pH próximo a 6 as espécies pentavalentes sofrem hidrólise e, conseqüentemente, somente as espécies trivalentes podem formar a arsina. Assim, as espécies de As(III) e As(V) podem ser mensuradas em razão da diferença de sinais obtido em pH 6 e 1, respectivamente. Foi otimizada a faixa de concentração ácida para a eficiente geração da arsina a partir das espécies de As estudadas. Uma solução de L-cisteína 2% foi adicionada as amostras e padrões pelo menos uma hora antes da análise para a geração não seletiva de arsina. A concentração de HCl resultante nas amostras foi 0,11 mol l⁻¹. O uso de uma solução tampão de pH (Tris 0,75 mol l⁻¹, pH 6) permitiu que a arsina fosse gerada

exclusivamente das espécies de As(III). Os autores destacaram a necessidade do emprego do multiatomizador para alcançar maior tolerância a atomização de interferentes e aumentar a faixa linear de calibração do procedimento proposto. A sensibilidade foi uniforme para todas as espécies e os limites de detecção em 0,5 ml de amostra foram de 0,18 e 0,06 ng (0,02 ng sem o emprego do corretor de fundo) para iAs e as espécies metiladas, respectivamente.⁷⁵

Em estudos posteriores, Zavala-Hernández *et al.*¹³³ utilizaram o mesmo sistema proposto anteriormente por Matousek⁷⁵ para determinação das espécies de As em tecido biológico em células cultivadas em iAs e em animais submetidos a dieta com água contaminada com iAs. Com o objetivo de aumentar os limites de detecção alcançados no trabalho anterior, o sistema foi automatizado e foi utilizado o multiatomizador. Os tecidos biológicos foram homogeneizados em água e decompostos utilizando ácido fosfórico 2 mol l⁻¹ e posterior neutralização dos digeridos com NaOH. A etapa de geração dos hidretos foi feita utilizando um sistema em fluxo automatizado, tampão Tris-HCl (pH 6), NaBH₄ 1% (m/v) em NaOH 0,02% (m/v), em uma vazão de 1 ml min⁻¹. Os hidretos foram carregados, utilizando uma mistura de gases He e H₂, em uma vazão de 76 e 15 ml min⁻¹, respectivamente. Os hidretos foram trapeados em um tubo em “U”, preenchido com 0,8 g de fase estacionária, envolvido por uma resistência elétrica e submerso em nitrogênio líquido. O uso do sistema automatizado permite que durante a etapa de geração dos hidretos, uma válvula solenóide é aberta e o cilindro contendo o tubo em “U”, é preenchido com nitrogênio. Em uma outra etapa, a válvula solenóide é fechada e o tubo era gradualmente aquecido até, aproximadamente, 150 °C, permitindo a separação das arsinas, pré-concentradas no tubo, de acordo com seus respectivos pontos de ebulição. Os autores também utilizaram amostras com adição de analito para ensaios de recuperação para as espécies As(III), As(V), MMA(III), MMA(V), DMA(III), DMA(V) e TMAO(V) e foi feita a determinação de As total por GF AAS, após a decomposição de 0,1 g das amostras com 10 ml de ácido nítrico, por aquecimento com radiação micro-ondas.

Após a etapa de determinação, foi observada uma separação eficiente das espécies investigadas, em tempos de retenção de 7,3 ± 0,09, 30,5 ± 0,63 e 39,9 ± 0,58 s para As(III), MMA(III) e DMA(III), respectivamente. Para as espécies de arsina geradas a partir das respectivas espécies pentavelentes, foram obtidos tempos de retenção de 7,8 ± 0,11, 30,0 ± 0,38 e 39,3 ± 0,40 s. Para verificar a interferência da

espécie de ácido dimetiltioarsínico (DMTA) (metabólito do iAs contendo S) na análise de DMA(III) e DMA(V) por HG-CT-AAS, foi feita uma comparação da eficiência de geração dos hidretos e comparação dos tempos de retenção das espécies. Foi observado que os tempos de retenção para a dimetilarsina gerada a partir das três diferentes espécies de As foram similares. Além disso, foi observado que a eficiência de geração dos hidretos a partir de DMA(V) foi de 2,3 a 3,5% e 4 a 11,7%, para DMA(V) e DMTA, respectivamente, na ausência de cisteína. No entanto, utilizando cisteína, a eficiência de geração dos hidretos para DMA(V) foi aumentada para 88 a 100%, enquanto que para DMTA, foi inferior a 37%. Com relação aos animais submetidos a dieta hídrica com água contaminada, foi observado que a espécie majoritária de As foi DMA e concentrações mais elevadas foram observadas no fígado, em comparação com o músculo. Foram obtidos limites de detecção na faixa de 9 a 20 pg para as espécies trivalentes e de 8 a 20 pg para as espécies pentavalentes de As e recuperações entre 78 e 117%.¹³³

Outros autores propuseram um método para a determinação de espécies de arsênio em água potável, células cultivadas em laboratório e urina humana de indivíduos expostos ao consumo de água contaminada com iAs. Após, a reação com NaBH_4 , as espécies voláteis foram retidas em um tubo preenchido com resina cromatográfica imerso em nitrogênio líquido e posteriormente determinadas por AAS. Além disso, os autores avaliaram a estabilidade das espécies de As(III) em água e urina humana evidenciando que as condições de armazenamento e composição da urina podem influenciar nos resultados da análise de especiação. Ademais, a estabilidade das espécies em urina humana foi correlacionada com a presença de compostos oxidantes e antioxidantes, sendo então fortemente dependente das fontes de alimentação do indivíduo analisado. Desta forma, o iAs(III) sofre oxidação mesmo quando as amostras são armazenadas em temperatura inferior a 4 °C e por menos de um dia. Espécies de MMA(III) e DMA(III) não foram encontradas em diferentes amostras de urina e, segundo os autores, este fato pode indicar que estas espécies são totalmente oxidadas em um curto espaço de tempo.³¹

Devesa *et al.*³³ propuseram um método para a determinação de metabólitos de arsênio em materiais biológicos empregando o método da HG AAS em pH seletivo. As espécies estudadas de iAs, MMA, DMA e TMAO foram pré-concentradas em um tubo de vidro na forma de "U" e posteriormente volatilizadas por aquecimento com uma resistência. Os autores ressaltaram, que o aumento do fluxo do gás

carreador durante a etapa de volatilização reduziu a difusão das espécies no momento da transferência para o espectrômetro e evitou o alargamento e sobreposição dos sinais analíticos. Os limites de detecção foram na faixa de 0,14 ng de As, para o TMAO em pH 6, a 0,40 ng de As para o As(V) em pH 1. Estes valores foram pelo menos uma ordem de magnitude maior que aqueles alcançados empregando o método de HPLC-HG-AFS, mas foram comparáveis com os limites de detecção publicados por Kaise *et al.*⁶² empregando uma etapa de aprisionamento criogênico com posterior determinação por HG-ICP-MS. A precisão do método variou entre 1,0 e 14,5% e as recuperações, dos analitos previamente adicionados, foram de 85,1 a 123,8% em amostras de urina humana e extratos celulares, ambas preparadas em uma solução de Triton 0,5%. Desta forma, ficou evidente que o método foi adequado para a análise de especiação de metabólitos de As em amostras de urina e meios celulares sem ser necessário aplicar uma etapa prévia de extração, digestão e/ou separação. Os limites de detecção alcançados são favoráveis para a análise de especiação em baixas concentrações e permitem que o procedimento seja aplicado para a rotina de análise em estudos metabólicos.

Posteriormente, Zavala-Hernández *et al.*¹³⁴ desenvolveram um método para a análise de especiação de As em tecido da bexiga e urina de indivíduos expostos ao As inorgânico, proveniente de água potável contaminada (contendo de < 1 a 190 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As). A determinação das espécies de iAs, DMA e MMA, foi feita utilizando a técnica de HG-CT-AAS com multiatomizador e sistema em fluxo. O tecido da bexiga separado por centrifugação por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o tecido separado foi tratado com Triton e, posteriormente, com L-cisteína 2% por 70 min a temperatura ambiente para redução das espécies de As(V) para As(III). A etapa de geração dos hidretos foi feita da mesma forma que no trabalho anterior. Foi observado que a concentração de As nas amostras de urina variou na faixa de 1,97 a 4,8 ng ml^{-1} , sendo DMA a espécie majoritária (69% dos metabólitos do iAs). Por outro lado, a concentração de As no tecido de bexiga foi na faixa de 0,18 a 11,4 ng mg^{-1} , o que representa uma concentração de 42% de iAs, enquanto que na urina, foi de 17%. De forma semelhante à urina, a espécie majoritária encontrada foi DMA (43%). Porém, os autores destacaram que não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de As encontrada na urina e no tecido da bexiga, para os mesmos indivíduos analisados. Foram obtidos limites de detecção de 12, 7 e 13 pg

para As(V), MMA(V) e DMA(V), respectivamente, e foram obtidos RSD na faixa de 0,7 a 3,1%.

A determinação de espécies de As (AsB, DMA, MMA) em materiais de referência certificados de origem marinha foi feita por Geng *et al.* para comparação das etapas de pré-tratamento por extração, seguida de HPLC e determinação por AFS e utilizando digestão alcalina e aprisionamento criogênico, onde a determinação das espécies de As foi feita por AAS.⁴⁶ Utilizando a técnica de HG-CT-AAS, as amostras (0,05 g) foram, previamente, submetidas a uma digestão alcalina com 5 ml de NaOH 2 mol l⁻¹ e mantidas sob aquecimento a 90-95 °C por 3 h. A etapa de geração dos hidretos foi feita utilizando 5 ml de NaBH₄ 10% (m/v) e 40 ml de HCl 1% (m/v), onde, posteriormente, a arsina foi trapeada por 3 min em um tubo em “U” de quartzo, imerso em nitrogênio líquido e, posteriormente, carregada com He em uma vazão de 500 ml min⁻¹. Para avaliar o pré-tratamento utilizando uma etapa de extração e HPLC, aproximadamente, 5 g de amostra foi submetida a uma etapa de extração com 10 ml de H₃PO₄ 0,25 mol l⁻¹ e, posterior, etapa de centrifugação por 12 h. Após, foi feita a determinação das espécies de As por HPLC-HG-AFS, utilizando uma coluna de poliestireno-divinilbenzeno e fase móvel composta por KH₂PO₄ 25 mmol l⁻¹ (pH 5,8). Os hidretos foram formados utilizando NaBH₄ 1,4% (m/v) em NaOH 0,1% (m/v) e HCl 1,5 mol l⁻¹, em uma vazão de 1,8 ml min⁻¹. Os autores observaram que, utilizando o método da digestão alcalina, praticamente, toda espécie de As trimetiladas e AsB foram convertidas, possivelmente, à TMAO e os arsenoaçúcares foram, provavelmente, convertidos a DMA. Ainda, foi observado que o uso da digestão alcalina e HG-CT-AAS, forneceu resultados, significativamente, superiores para DMA, em comparação com o método de extração e HPLC-HG-AFS.

Recentemente, Diaz-Bone *et al.*³⁴ utilizaram a técnica de HG e aprisionamento criogênico para posterior determinação das espécies de As, MMA(V), DMA(V) e TMAO(V) e outros elementos, como Ge, Sn, Sb, Te e Hg, por cromatografia à gás (GC) e ICP-MS em amostras de ambientais. Com o objetivo de contornar os problemas relacionados à etapa de derivatização por HG, os autores desenvolveram um sistema em fluxo semi-automático para geração dos hidretos, utilizando gradiente de pH. Desta forma, os hidretos eram formados em um reator, onde as soluções de NaBH₄ 1 mol l⁻¹ (em NaOH 0,1 mol l⁻¹), HCl 2 mol l⁻¹ e tampão (para efetuar o gradiente de pH na faixa de 1 a 7) foram adicionadas continuamente. Após, os hidretos foram carregados (utilizando He, 100 ml min⁻¹) e trapeados em um

tubo em “U”, feito em vidro, preenchido com uma fase estacionária. Para reduzir o tempo total de análise (15 min), foram utilizados dois tubos em “U”, em paralelo, para o aprisionamento criogênico. Além disso, um segundo tubo em “U” foi utilizado para investigação de possíveis perdas de analito no sistema cromatográfico. Assim, após uma análise, o eluato era redirecionado para este segundo tubo em “U” para efetuar, novamente, a etapa de aprisionamento criogênico e análise por GC-ICP-MS.

A coluna utilizada para separação das espécies do cromatógrafo a gás foi preenchida com a mesma fase estacionária. É importante destacar que os tubos e a coluna cromatográfica foram imersos em nitrogênio líquido e após o início da eluição das espécies da coluna, o nitrogênio líquido foi removido da parte externa da coluna e dos tubos em “U”. Os autores destacaram que, ao contrário de outros estudos mostrados na literatura⁴⁹, não foi necessário remover a água do sistema devido ao elevado diâmetro interno do tubo e da coluna cromatográfica, que por sua vez, preveniu o bloqueamento do tubo, visto que a introdução contínua do aerossol no plasma não é influenciada pela água.

Cabe destacar que, embora a remoção da água do sistema foi evitada pelo uso de um tubo interno com diâmetro maior, muitas vezes, a resolução pode ser prejudicada pelo uso de diâmetros maiores. Além disso, foi observado que, apesar dos baixos limites de detecção que podem ser alcançados por GC-ICP-MS, os valores de branco foram altos devido às impurezas nos reagentes. Foi observado através do uso do sistema de recirculação do eluato no tubo, que ocorreu perdas de TMAO(V) durante a análise. Com relação aos estudos feitos em diferentes pH, foi verificado que em condições neutras, a eficiência de formação dos hidretos das espécies DMA(V) e MMA(V) foi baixa devido à baixa reatividade destas espécies com NaBH₄, nesta faixa de pH. Por outro lado, foi observado que o efeito de metilação das espécies TMAO e DMA aumentou com a diminuição do pH. Utilizando o método de gradiente de pH, foi obtida eficiência de geração dos hidretos superior, ou no mínimo, equivalente em comparação com o método de pH constante e a formação de espécies com grau inferior de metilação foi, significativamente, inferior em meio ácido. Desta forma, os ensaios foram feitos em pH 1. Foram obtidas recuperações superiores a 90% para as espécies metiladas e o RSD para as espécies de As foi de, aproximadamente, 30%. Utilizando o procedimento com gradiente de pH, foi possível determinar as espécies de todos os analitos

investigados, obtendo elevada frequência analítica. Os limites de detecção para as espécies MMA, DMA e TMAO foram de 21, 10 e 2 pg, respectivamente.³⁴

Em outro estudo, Tsalev *et al.*¹¹⁹ utilizaram um sistema em fluxo automatizado para determinação de As(V), MMA(V), DMA(V) por HG AAS e HPLC-HG-AAS, onde foi avaliada a cinética de pré-redução e complexação das espécies na presença de L-cisteína e em função da temperatura, utilizando NaBH₄ 1% (m/v) e HCl 0,05 mol l⁻¹. Para a determinação por HPLC-HG-AAS, foi avaliado o uso de colunas de troca catiônica, troca aniônica e com fase reversa, utilizando fase móvel de tampão fosfato, com diferentes faixas de pH (2,8 a 9,2). Os autores verificaram que a L-cisteína, devido à suas propriedades ácido-base, forma, possivelmente, um íon bipolar em meio levemente ácido (pH 3 a 7) e atinge sua forma protonada em pH < 3-4. Desta forma, este reagente irá atuar, predominantemente, como uma espécie catiônica na faixa de pH 1-4, que é normalmente utilizada para a etapa e pré-redução, complexação e posterior formação dos hidretos. Portanto, foi observado que a separação das espécies por HPLC, utilizando a L-cisteína, foi favorecida com o uso de colunas de troca catiônica. Os complexos de As(III), MMA e DMA com L-cisteína foram retidos, fracamente, na coluna de troca aniônica, sendo eluídos facilmente e sem separação da linha de base, mesmo utilizando vazões (0,6 a 0,8 ml min⁻¹) e concentração (0,5-1 mmol l⁻¹) da fase móvel baixos. Ainda, foi observado que modificações no pH da fase móvel não alteraram a separação. Utilizando a coluna com fase reversa, a espécie DMA foi retida, fortemente, na coluna, principalmente, em baixos valores de pH (por exemplo, pH 2,8). Por outro lado, as espécies de As(III) e MMA não são separadas em pH superior a 3. Foi verificado que a cinética de pré-redução e complexação seguiram a ordem: As(V) < DMA < MMA. Desta forma, o As(V) foi pré-reduzido e complexado em um tempo inferior a 50 s a 70-100 °C e 1 h em temperatura ambiente, enquanto que o MMA e DMA necessitaram de 1,5 a 2 min a 70-100 °C e de 1 a 2 h a temperatura ambiente.

Com relação à determinação de As em amostras de fármacos, utilizando a técnica de HG AAS, poucos trabalhos foram encontrados na literatura^{44,108}. Nestes trabalhos, foi desenvolvido um procedimento para determinação de As em medicamento à base de Sb(V) por HG AAS. As amostras foram tratadas com uma mistura de ácido clorídrico e nítrico e, posteriormente, foi feita uma diluição com água. Os parâmetros avaliados para o procedimento proposto foram: condições da etapa de tratamento da amostra (tempo, temperatura, concentração do meio ácido e

tipo de ácidos avaliados), concentração do NaBH_4 , ácido cítrico, tempo de purga, tempo de injeção e avaliação da interferência de Cu, Ni, Pb e Bi. As melhores condições foram alcançadas utilizando NaBH_4 1,5% (m/v), ácido cítrico 10% (m/v), tempo de injeção e purga de 15 e 30 s, respectivamente. Os autores observaram que os limites de tolerância para Ni(II), Cu(II) e Pb(II) foram de 1 mg, 100 e 100 μg , respectivamente. Foi verificado que, a adição de ácido cítrico na amostra (pelo menos em contato de 1 h) atuou como complexante do Sb(V), impedindo que ocorresse a formação deste hidreto e, conseqüentemente, causando uma diminuição na interferência sobre o As. Foi obtido limite de detecção de 0,8 mg l^{-1} e recuperações superiores a 98%.^{44,108}

Cabe destacar que não foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo a determinação das espécies de As em amostras de fármacos, sendo encontrados, nestas amostras, apenas trabalhos que descrevem a determinação da concentração total de As, conforme descrito anteriormente.

2.4.3. LC-ICP-MS aplicada à análise de especiação

Nos últimos anos, vários sistemas têm sido propostos para análise de especiação, usando diferentes técnicas de separação e detecção. No entanto, devido à algumas características, como, versatilidade, robustez, sensibilidade e capacidade multielementar, o acoplamento da cromatografia à líquido com a técnica de ICP-MS têm sido um dos mais utilizados para estudos de especiação em diferentes matrizes.⁸⁷ O início do uso da LC acoplada à ICP-MS teve como principal vantagem, contornar algumas limitações observadas no acoplamento da LC com F AAS e ICP OES, como dificuldade de determinação de alguns elementos em baixas concentrações, o que normalmente é observado em análise de especiação. Desta forma, com o desenvolvimento da técnica de ICP-MS, foi possível aumentar a sensibilidade, faixa linear e a precisão alcançadas e ainda melhorar os limites de detecção.⁶⁸

Uma das vantagens mais importantes associadas ao uso da LC para análise de especiação, é a elevada disponibilidade de diferentes fases estacionárias e fase móvel que podem ser utilizadas, o que permite a análise de diferentes espécies de um mesmo elemento. Por outro lado, a escolha do mecanismo de separação

adotado deve ser levada em consideração para a preservação das espécies originais na amostra e a separação adequada destas, visto que muitas fases estacionárias e tampões podem causar modificação das espécies.^{82,126} O acoplamento pode ser feito diretamente na saída da coluna com o nebulizador e permite a compatibilidade das vazões utilizadas pelas duas técnicas.⁶⁸

Apesar do acoplamento entre LC e ICP-MS possibilitar algumas vantagens, uma das principais limitações é com relação à composição da fase móvel utilizada, onde a presença de solventes orgânicos, sais e tampões, podem acarretar em mudanças na sensibilidade, ionização no plasma e instabilidade deste, depósitos de carbono no cone e *skimmer* e bloqueamento destes pela elevada presença de sais (por exemplo, tampões utilizados na composição da fase móvel). Ainda, é necessária a escolha de uma condição de compromisso entre uma boa separação das espécies por LC e detecção adequada, relativamente, livre de interferências e com razão sinal/ruído adequada para a quantificação. Além disso, a interface utilizada não deve fornecer um elevado volume morto para preservar a resolução alcançada pela cromatografia e evitar alargamento dos sinais.^{1,84}

Devido ao fato que nos últimos anos, mais estudos vêm sendo feitos para avaliar as diferentes espécies de um mesmo elemento em diversos tipos de amostras, para elucidar mecanismos de mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade das diferentes espécies, o acoplamento LC-ICP-MS vem sendo utilizado para a determinação de espécies de As, entre outros elementos.⁸³ Vários trabalhos recentes utilizam as técnicas de LC-ICP-MS para especiação de As em amostras biológicas^{86,88,114,132}, entretanto, para determinação das espécies de As em amostras de fármacos, que é um dos objetivos deste trabalho, não foram encontrados trabalhos na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de arsênio em material biológico e medicamento foi feita utilizando um espectrômetro de absorção atômica PerkinElmer (AAAnalyst 800, Überlingen, Alemanha), equipado com atomizadores com chama, forno de grafite e aquecimento eletrotérmico, amostradores automáticos (AS-90A e AS-800) e sistema de injeção em fluxo automatizado (FIAS 400). Para a determinação de As empregando a técnica de geração de hidretos foi utilizada uma cela de quartzo (multiatomizador, ver Item 3.5.5) aquecida eletricamente a uma temperatura de 900 °C.

Para as determinações de As o instrumento foi equipado com uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL) como fonte de radiação com corrente de 376 mA. O comprimento de onda e largura da fenda selecionados foram de 193,7 e 0,7 nm, respectivamente. Para a correção do sinal de fundo foi utilizada uma lâmpada de deutério. Toda programação do instrumento, controle dos acessórios e obtenção dos sinais analíticos foi feita empregando o *software* PerkinElmer *WinLab 32 for AA*, versão 6.5.0.0266. A obtenção dos sinais analíticos foi feita no modo de absorbância integrada e, posteriormente, para a integração dos sinais foi utilizado o *software* Excel (Microsoft Office).

Uma válvula solenóide (Rheodyne 5302, Rohnert Park, EUA) foi utilizada para controlar a entrada e saída de nitrogênio líquido com o emprego do sistema automatizado para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS. Na etapa de aprisionamento, a válvula foi aberta para que o nitrogênio líquido do frasco mais externo preenchesse o interior do frasco de vidro. Na etapa de volatilização, a válvula foi fechada para que o nitrogênio fosse expulso do frasco de vidro por aquecimento. O fornecimento de energia para o aquecimento da resistência elétrica durante a etapa de volatilização das espécies foi feito por uso de uma fonte (Laboratory power supply, mod. EA-PS 3065-10B, Viersen, China) com faixa de trabalho de 0 - 65 V e 0 - 10 A.

Para o controle da vazão do gás auxiliar na etapa de atomização (ar atmosférico) e dos gases de arraste (He e H₂) foram utilizados fluxômetros de massa (FMA-2604A ou 2618A, Omega Engineering, Stamford, EUA).

O ajuste do pH para o preparo da solução tampão (HG-CT-AAS), fase móvel (LC-ICP-MS) e após o procedimento de extração em meio ácido foi feito utilizando um potenciômetro digital (Mettler Toledo, SevenEasy pH, Schwerzenbach, Suíça) equipado com um eletrodo de vidro combinado e com sensor de temperatura.

Na análise de especiação de As em material biológico com amostragem direta de suspensão foi utilizado um agitador magnético (Ika, Lab disc white, Staufen, Alemanha) para homogeneização, previamente à análise.

Os ensaios para a extração seletiva das espécies de As em meio ácido em amostras biológicas foram efetuados em bloco digestor (Tecator ab, Suécia) com frascos de vidro com capacidade de 75 ml e com controle de temperatura manual por imersão de um termômetro de mercúrio.

A determinação de arsênio total foram feitas em espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) PerkinElmer SCIEX (ELAN[®] DRC II, Thornhill, Canada), equipado com sistema de nebulização pneumático composto por nebulizador do tipo concêntrico (Meinhard[®], Golden, EUA) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion Inc., West Welbourn, Austrália). Uma tocha de quartzo com tubo injetor com 2 mm d.i. e argônio (pureza > 99,998%, White Martins, São Paulo, Brasil) foram empregados para a formação do plasma. Os parâmetros operacionais selecionados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais da técnica de ICP-MS.⁹⁸

Parâmetro	
Potência do gerador de rádio frequência	1400 W
Frequência do gerador de rádio frequência	27 MHz
Vazão de Ar principal	15 l min ⁻¹
Vazão de Ar auxiliar	1,20 l min ⁻¹
Vazão de Ar nebulizador	1,07 l min ⁻¹
“Sampler” e “Skimmer”	Pt
Resolução	0,7 u
As (m/z)	75
Varreduras/leituras	1
Replicatas	1
“Dwell time”	250 ms
Leituras/replicata	7114
Lente inônica	“Auto lens” (On)
Modo de medida	“Peak hopping”
Modo de operação do detector	“Dual”
Modo de operação do instrumento	Sem DRC (Standard)
“Dead time”	40 ns

Adicionalmente, a análise de especiação de As em amostras biológicas e fármacos por LC-ICP-MS foi feita utilizando um sistema constituído por uma bomba de alta propulsão (Series 200 LC Pump, PerkinElmer), um degaseificador a vácuo (Series 200 Vacuum Degasser, PerkinElmer), uma coluna de troca aniônica Hamilton (PRP-X100 com 250 mm de comprimento, 4,1 mm d.i. e 10 µm de diâmetro de partícula, Hamilton, Reno, EUA). Para o preenchimento da alça de injeção com capacidade de 200 µl, uma seringa de polietileno com ponteira metálica e capacidade de 1000 µl foi utilizada. Uma válvula manual Rheodyne foi utilizada para as injeções das soluções.

Todas as pesagens foram feitas em balança analítica digital Shimadzu (AY220, Japão) com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 220 g.

3.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em coluna de troca iônica convencional e, posteriormente, purificada em sistema Milli-Q® (Ultrapure Water Purification System, Millipore, Bedford, EUA), apresentando resistividade final de 18,2 MΩ cm.

As soluções de calibração de As(III) na forma inorgânica, MMA(V), DMA(V) e TMAO(V) foram obtidas a partir da dissolução dos sais de As₂O₃ (Lachema, Brno, República Tcheca), Na₂CH₃As₂O₃.6H₂O (Chem. Service, West Chester, EUA), H(CH₃)₂AsO₂ (Strem Chemicals Inc., Newburyport, EUA) e (CH₃)₃AsO (cortesia do Dr. Willian Cullen - University of British Columbia, Vancouver, Canadá e Dr. Tomáš Matousek - Academia de Ciências da República Tcheca) em água, respectivamente. Previamente ao preparo da solução de calibração de As(III), nitrogênio gasoso com vazão de 2,5 l min⁻¹ foi borbulhado por 30 min em água para a remoção do oxigênio dissolvido. As soluções de calibração para a determinação de As total por ICP-MS foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque comercial SCP MS 33 (SCP Science, Baie-d Urfé, Canadá) a 10 mg l⁻¹ em HNO₃ 5% (v/v).

Para a determinação de As utilizando HG-CT-AAS, o tubo em “U” foi preenchido com a fase estacionária de suporte à base de diatomita (sílica) recoberto por grupos siloxanos (-Si-O-Si-) com tamanho de partícula de 45 a 60 mesh (Chromosorb WAW-DCMS 45/60 - 15%OV-3, Supelco, St. Louis, EUA).

Ácido nítrico concentrado P.A. (65%, 1,4 kg l⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi destilado abaixo de seu ponto de ebulição em sistema de destilação de quartzo (Milestone, mod. duoPur 2.01E, Sorisole, Itália) e utilizado nos procedimentos de descontaminação dos materiais utilizados. Os ácidos fluorídrico (48%, 1,15 kg l⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fosfórico suprapur® (85%, 1,68 kg l⁻¹, Merck) foram empregados nos procedimentos de descontaminação da cela de quartzo e extração, respectivamente.

Soluções de borohidreto de sódio 1% (m/v) foram preparadas a partir de NaBH₄ (com pureza > 97%, Sigma, St. Louis, EUA) e estabilizadas em KOH 0,2% (m/v) (Lachema). Após filtração, a solução de borohidreto de sódio foi usada imediatamente ou congelada para melhor conservação e posterior uso. Para redução das espécies pentavalentes de As, etapa de pré-redução, L-cisteína (com

pureza > 99%, Merck) foi adicionada às soluções de calibração e amostras para obter concentração final de 2% (m/v).

Para o controle do pH na HG-CT-AAS, uma solução na concentração de 0,75 mol l⁻¹ à pH 6 foi preparada pela dissolução de Trizma[®] (NH₂C(CH₂OH)₃.HCl, com pureza > 99%, Sigma) em água. O ajuste do pH foi feito com adição de uma solução de KOH 10 mol l⁻¹.

Com o objetivo de reduzir a formação de espuma excessiva durante a reação de redução do borohidreto de sódio com a suspensão de material biológico, anti-espumante (B, Sigma) foi adicionado à solução de borohidreto de sódio para obter concentração final de 1% (m/v).

Nas determinações de As por HG-CT-AAS em fármacos à base de Sb(V), foi utilizado ácido cítrico (Lachema) para complexar o Sb e, assim, minimizar a interferência de Sb na determinação de As, conforme estudos relatados na literatura.^{44,108}

Para a determinação de As por LC-ICP-MS, a fase móvel foi preparada, previamente ao uso, pela dissolução de fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄, Merck) em água. O pH foi ajustado com adição de ácido nítrico concentrado ou hidróxido de amônio (25%, 0,91 kg l⁻¹, Merck).

3.3. MATERIAS DIVERSOS

Para a remoção do material particulado das soluções de borohidreto de sódio e solução tampão, previamente ao uso, foi utilizado um sistema de filtração (Nalgene, Rochester, EUA) a vácuo com membrana de náilon 0,45 µm (Whatman, Maidstone, EUA).

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por, pelo menos, 24 horas e, posteriormente, enxaguados com água previamente ao uso. A limpeza da cela de atomização, utilizada na técnica de geração de hidretos, foi feita periodicamente por imersão total em uma mistura de HNO₃ concentrado e HF concentrado na proporção de 7:3, por 10 min. Após, a cela foi enxaguada com água e seca.

3.4. AMOSTRAS

Uma amostra de material biológico de fígado de frango, destinada ao consumo humano foi adquirida em estabelecimento comercial e utilizada na otimização da metodologia de análise de especiação de As.

As amostras do medicamento antimoniato de meglumina foram obtidas de fornecedores deste medicamento para o mercado farmacêutico brasileiro. Os diferentes lotes do fármaco foram diluídos com água previamente a análise e foram arbitrariamente denominados de A, B, C, D e E. Cabe destacar que os lotes do medicamento utilizado neste trabalho possuem formulações diferentes, de acordo com estudos feitos pela indústria responsável. Desta forma, os lotes A e B correspondem às formulações comerciais do medicamento. Entretanto, os lotes C, D e E são formulações diferentes de acordo com ensaios feitos na linha de produção do fabricante e não representam o produto na forma comercial.

Para validação da metodologia proposta foram empregados materiais de referência certificados de tecido de ostra (NBS 1566 - *Oyster Tissue* - *National Bureau of Standards*) e águas de superfície de rio e de origem oceânica (SLRS-4 *River water reference material for trace metals*, CASS-4 *Nearshore seawater reference material for trace metals*, NASS-5 *Open ocean seawater reference material for trace metals* - *National Research Council Canada* - NRCC).

3.4.1. Procedimento de preparo de suspensão do material biológico

Para o procedimento de preparo da suspensão de material biológico um conjunto composto por um frasco de vidro e pistilo de PTFE com haste metálica para homogeneizar tecidos celulares foi utilizado.

Inicialmente, o material biológico (fígado de frango) foi cortado em pequenos pedaços com o uso de um estilete utilizado em procedimentos cirúrgicos. A amostra foi pesada diretamente em um frasco de vidro com capacidade de 50 ml. Após, o frasco e a amostra foram inseridos em um banho de gelo para que a temperatura se mantivesse relativamente baixa e, com isso, interconversão e mudança no estado de oxidação das espécies fosse minimizada. Foi feita a adição de água em um volume três vezes superior a massa de material biológico, inicialmente pesada.

A haste do pistilo foi conectada ao mandril de uma furadeira de bancada, previamente configurada na velocidade de 1500 rpm e, posteriormente, o frasco de vidro com amostra e água foi embutido manualmente no pistilo. Cabe destacar, que o procedimento de homogeneização foi baseado no atrito do pistilo contra as paredes do frasco de vidro e, desta forma, o material sólido foi distribuído uniformemente na solução sem que houvesse danos às estruturas subcelulares. Durante toda a etapa de homogeneização um banho de gelo foi utilizado para evitar o aquecimento do frasco e consequente interconversão das espécies. Para a melhor homogeneização do material, a altura do frasco foi alternada em movimentos de inserção lenta do pistilo até a base do frasco de vidro e posterior retorno ao topo. Além disso, foi utilizada uma gaze para a remoção do tecido não homogeneizado. A suspensão homogeneizada foi transferida para um balão volumétrico e foi feita a adição do tensoativo Triton X-100 (Merck) para uniformizar a distribuição das partículas em solução. Em seguida, o volume foi aferido de acordo com a concentração da suspensão desejada.

A suspensão obtida foi empregada diretamente na metodologia de análise de especiação por HG-CT-AAS ou congelada por, no máximo por 5 dias, para posterior uso.

3.5. MONTAGEM DO SISTEMA HG-CT-AAS

3.5.1. Procedimento de análise por injeção em fluxo (FIA)

Na montagem do sistema FIA foram utilizados tubos de politetrafluoretileno – PTFE (VICI, Schenkon, Suíça) com 1,58 mm d.e. e 1,0 mm d.i. para a adição dos reagentes e amostra. Para condução dos analitos na fase de vapor até o tubo em “U”, um tubo de PTFE com 3,16 mm d.e. e 1,3 mm d.i. foi utilizado.

Nos pontos de confluência dos reagentes foram empregadas conexões poliméricas em poliétercetona (PEEK) em forma de “T” e flanges (RheFlex F6 ou F8, Rheodyne). Simultaneamente, os três reagentes foram deslocados com a mesma vazão de 2 ml min⁻¹: água como solução carreadora, tampão e agente redutor. Para a propulsão das três soluções, tubos de Tygon[®] de diversos diâmetros foram utilizados de acordo com as etapas do programa FIAS.

Para a injeção da amostra, uma alça de amostragem com capacidade de 0,5 ml (318 mm de comprimento) foi empregada. As etapas de preenchimento e injeção da alça de amostragem foram feitas de acordo com as etapas do sistema FIAS mostradas posteriormente na Tabela 3. Adicionalmente, uma alça de reação com capacidade de 1,57 ml (1000 mm de comprimento) foi utilizada para promover a mistura reacional e, posterior, geração das espécies voláteis.

3.5.2. Separador gás-líquido (GLS)

Um frasco de polipropileno de fundo cônico (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) com capacidade para 50 ml e tampa de polipropileno rosqueada foi, previamente, modificado para ser utilizado como separador gás-líquido (GLS, Figura 8). Esta modificação foi necessária para que o frasco suportasse a pressão (0,2 - 0,3 atm) causada pela resistência à passagem do gás carreador pelo tubo em “U”. Desta forma, uma tampa de acrílico com três orifícios, de encaixe rosqueado para a inserção de flanges de PEEK (RheFlex F6 ou F8), foi inserida na parte superior do frasco.



Figura 8. Foto do frasco de polietileno modificado utilizado como separador gás-líquido na análise de especiação por HG-CT-AAS.

A mistura reacional foi inserida por um tubo de PTFE (1,58 mm d.e.), juntamente com o gás carreador, de modo que este ficasse em contato com a parede do frasco GLS para minimizar a formação de aerossol. Além disso, para evitar a formação do aerossol, a ponta do tubo foi cortada em um ângulo de 45° e o tubo foi inserido até a meia altura do frasco. No segundo orifício, foi introduzido um tubo de PTFE (1,58 mm d.e.) até a base do frasco para conduzir a mistura reacional para o descarte após a análise. O terceiro orifício foi utilizado para conduzir as espécies voláteis até a etapa de aprisionamento criogênico e, para isso, um tubo de PTFE (d.e. 3,16 mm) foi utilizado.

3.5.3. Preparo do tubo para a etapa de aprisionamento criogênico

Para os estudos de determinação de As por HG-CT-AAS foram utilizados tubos de vidro e quartzo em forma de “U”. Os tubos possuíam as seguintes dimensões: 305 mm de comprimento, 4,5 mm d.e., 2,5 mm d.i. e largura de 34 mm (vidro) e 24 mm (quartzo). Os tubos foram adquiridos diretamente de uma empresa especializada na produção de artefatos de vidro e quartzo. Os tubos de vidro e quartzo foram descontaminados e secos e, posteriormente, preenchidos com 0,65512 g e 0,61024 g da fase estacionária, respectivamente. Após o preenchimento, os tubos foram tratados com um agente silanizador (Rejuv[®], Sigma), de acordo com as recomendações do fabricante. A aplicação de uma etapa de silanização previamente à análise tem sido utilizada para reduzir a interação da fase estacionária com os analitos e, assim, minimizar a possibilidade de perdas por retenção. Ambos os tubos foram uniformemente envolvidos por uma resistência metálica de composição Ni80/Cr20 (0,51 mm de diâmetro/5,275 Ω m⁻¹, Omega Engineering, Stamford, EUA) com resistência total de 15 Ω .

A parede externa dos tubos foi manualmente recoberta pela resistência que, posteriormente, foi fixada com cola de silicone. A resistência foi conectada a uma fonte de alimentação com o uso de um cabo de força. Uma rolha de cortiça com 40 mm d.e. foi dividida ao meio e, posteriormente, colada com silicone para fixar o tubo e o cabo de força. Esta mesma rolha foi utilizada como tampa do frasco de vidro na etapa automatizada de aprisionamento criogênico, conforme mostrado na Figura 9.

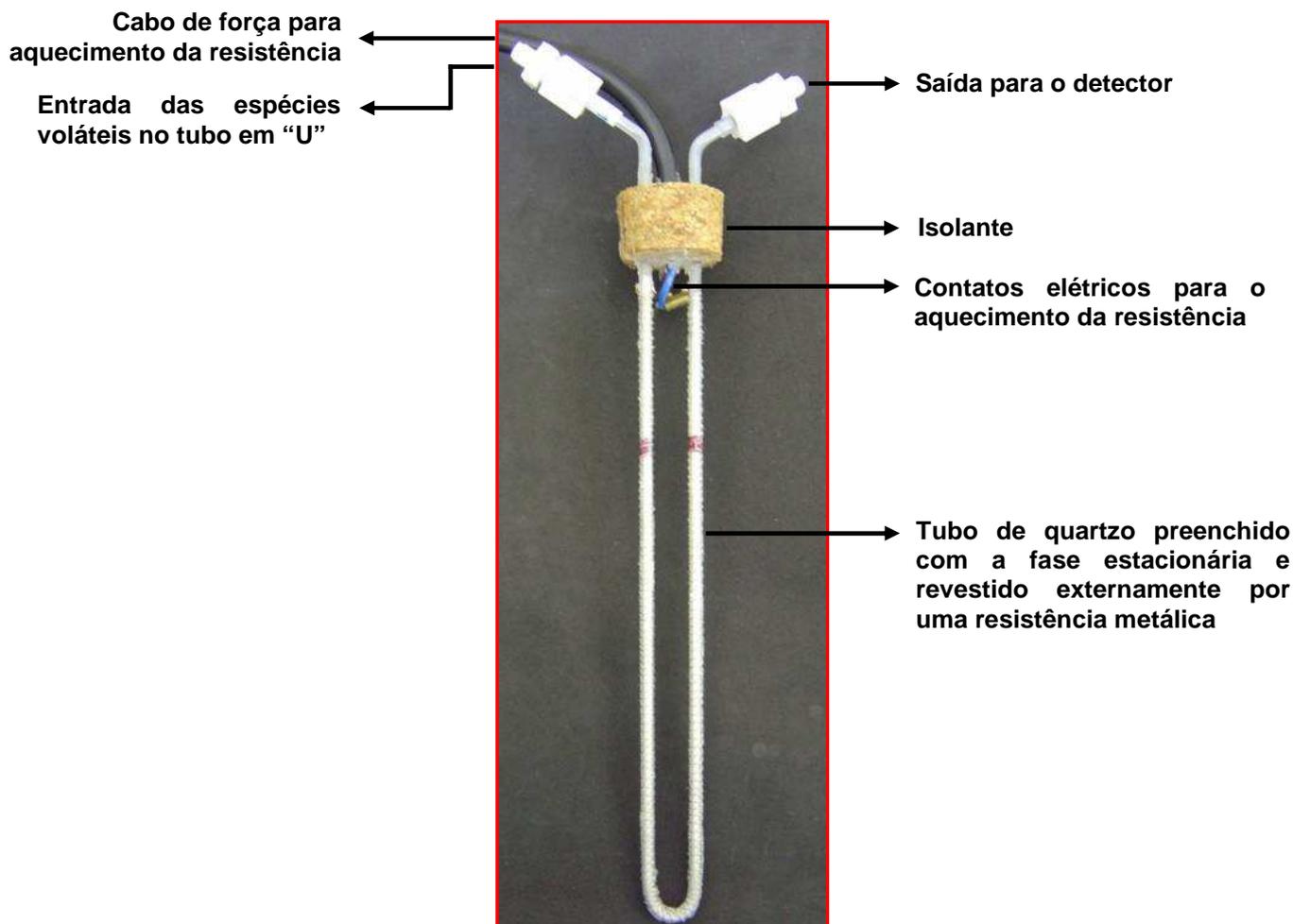


Figura 9. Foto do tubo em "U" de quartzo utilizado no procedimento de aprisionamento criogênico durante a etapa de pré-concentração na determinação de As por HG-CT-AAS.

3.5.4. Frasco de vidro para o procedimento automatizado

O tubo em forma de "U" foi inserido em um frasco de vidro e, em seguida, selado com o uso de cola de silicone. O frasco de vidro (310 mm de comprimento e 40 mm de d.i.) com parede dupla evacuada foi utilizado durante o procedimento automatizado para a análise de especiação (Figura 10). O frasco de vidro fica imerso em nitrogênio líquido dentro de um frasco térmico com capacidade para 4,3 l (135 mm de d.i.), preenchido com nitrogênio líquido e recoberto por uma capa isolante de polipropileno. O frasco de vidro possui um orifício, localizado próximo a sua base,

para a entrada de nitrogênio líquido e uma abertura superior perto do topo, onde fica localizada a válvula solenóide. Como anteriormente mencionado, a válvula solenóide, controlada pelo sistema FIAS, permanece aberta durante a etapa de aprisionamento para que o nitrogênio líquido possa preencher todo o volume do frasco de vidro. Durante a etapa de volatilização, com o aquecimento da resistência, a válvula solenóide é fechada para que a etapa de pré-aquecimento promova a vaporização do nitrogênio e o expulse do interior do frasco de vidro.

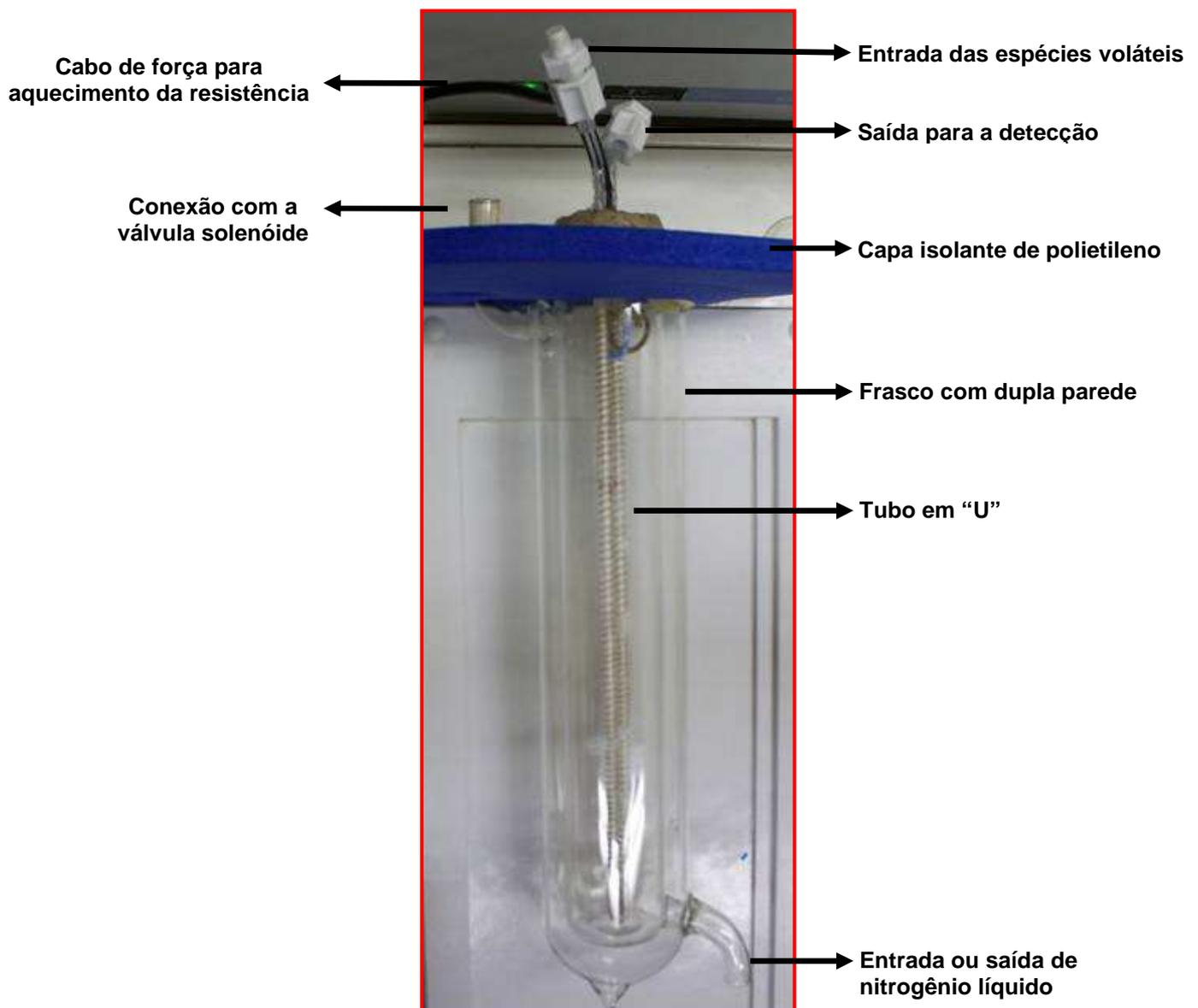


Figura 10. Foto do frasco com dupla parede utilizado na etapa de aprisionamento criogênico no procedimento de HG-CT-AAS automatizado.

Cabe ressaltar, que as espécies são separadas parcialmente de acordo com a interação com a fase estacionária visto que, o interior do tubo em “U” foi preenchido com material cromatográfico. Além disso, como o tubo fica imerso em nitrogênio líquido (temperatura de ebulição de $-186\text{ }^{\circ}\text{C}$) e as espécies possuem diferentes pontos de ebulição, como por exemplo, arsina (AsH_3), metilarsina (CH_3AsH_2), dimetilarsina ($(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$) e a trimetilarsina ($(\text{CH}_3)_3\text{As}$) $-55, 2, 35$ e $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Assim, quando se aplica a etapa de aquecimento, as espécies são volatilizadas gradativamente à medida que a temperatura no interior do tubo aumenta. De forma resumida, a separação das espécies ocorre de acordo com o ponto de ebulição e perfil cromatográfico.

3.5.5. Multiatomizador

Um tubo de quartzo modificado foi utilizado como célula de atomização na etapa de determinação de As. O atomizador consiste de dois tubos concêntricos de quartzo com 120 mm de comprimento, 14 mm d.e. e 7 mm d.i. Adicionalmente, o tubo de menor diâmetro possui 14 orifícios de diâmetro entre 0,1 e 1,0 mm e através destes orifícios é feita a comunicação com o tubo externo. Uma vazão de 35 ml min^{-1} de ar foi adicionada ao tubo externo como fonte adicional de oxigênio. A Figura 11 mostra os detalhes do atomizador utilizado.⁷⁴

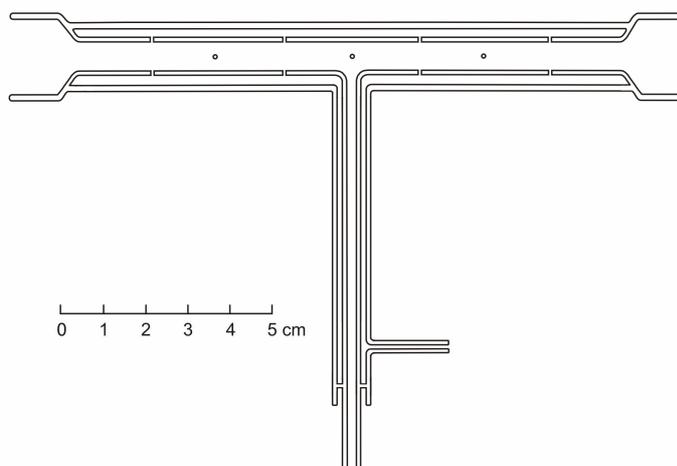


Figura 11. Multiatomizador de quartzo (*multiatomizer*) utilizado para a determinação de As.

3.6. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EMPREGANDO PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO E DETERMINAÇÃO POR HG AAS COM MULTIATOMIZADOR (HG-CT-AAS)

O sistema empregado para a análise de especiação de As foi proposto por Matousek *et al.*⁷⁵ O procedimento é baseado na geração seletiva de hidretos voláteis de compostos trivalentes e pentavalentes de As, conforme o pH da solução. Após a geração, os compostos foram trapeados em um tubo com formato em “U”, preenchido com uma fase estacionária, e imerso em nitrogênio líquido. O tubo foi aquecido e após, as espécies foram volatilizadas e determinadas por AAS. A Figura 12 mostra o sistema utilizado na análise de especiação de As por HG-CT-AAS.

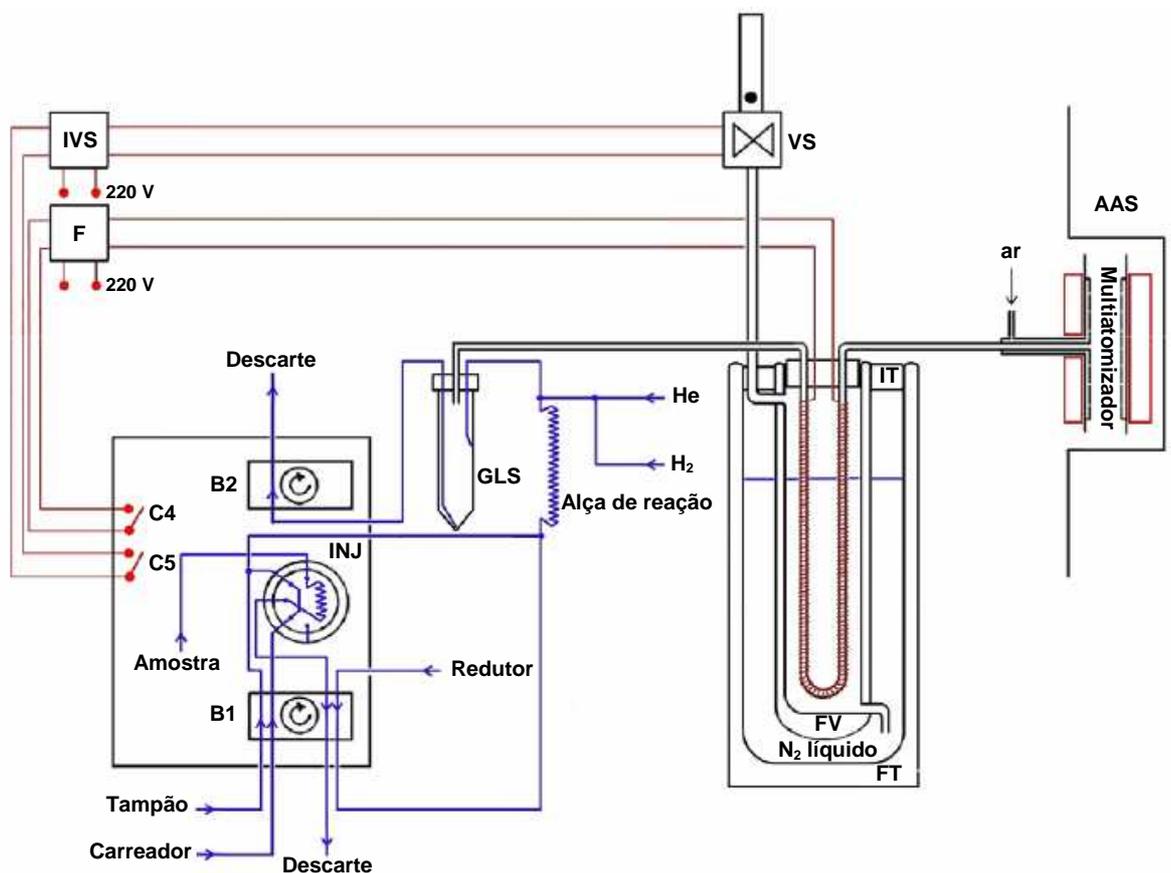


Figura 12. Sistema utilizado para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS. Onde: B1 e B2: bombas peristálticas; INJ: injetor; C4 e C5: controladores FIAS; F: interruptor da fonte; IVS: interruptor da válvula solenóide; VS: válvula solenóide; GLS: separador gás-líquido; IT: isolante térmico; FV: frasco de vidro; FT: frasco térmico.

O sistema automatizado empregado para especificação de As foi totalmente controlado pela unidade FIAS 400, acessório do espectrômetro de absorção atômica. Desta forma, o controle da válvula solenóide, fonte para aquecimento da resistência, bombas peristálticas e válvula de injeção foi, totalmente, mecanizado. As etapas do programa FIAS são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Etapas do programa automatizado para a análise de especificação de As por HG-CT-AAS.

Etapa	Tempo (s)	Bomba 1* (rpm)	Bomba 2** (rpm)	Válvula	Leitura	Solenóide	Aquecimento
0	20	55	100	-	-	aberta	não
1	60	55	-	injeção	-	aberta	não
2	90	-	-	injeção	-	aberta	não
3	23	-	-	-	-	fechada	sim
4	25	-	-	-	-	fechada	sim
5	8	-	-	-	58 s	fechada	não
6	25	-	-	-	-	fechada	sim
7	70	-	100	-	-	aberta	sim
8	80	-	-	-	-	aberta	não

* Bomba 1 utilizada para adição dos reagentes e amostra

** Bomba 2 utilizada para envio da mistura reacional para o descarte

A sequência de etapas da Tabela 3 foi adaptada de Matousek *et al.*⁷⁵ Contudo, alguns ajustes foram efetuados para alcançar uma melhor eficiência de separação das espécies de As que, serão melhor discutidos no item 4 apresentação e discussão dos resultados.

Inicialmente, a etapa 0 foi empregada para o preenchimento dos capilares e da alça de amostragem com os reagentes (NaBH₄, tampão e água) e a amostra a ser analisada, respectivamente. Na etapa 1, os reagentes foram adicionados, sucessivamente, por 60 s com vazão de 2 ml min⁻¹ juntamente com a amostra injetada na solução carreadora. Após a mistura dos reagentes e amostra na alça de reação e consequente formação dos hidretos, a solução resultante foi introduzida no separador gás-líquido, juntamente com os gases de arraste He (75 ml min⁻¹) e H₂ (15 ml min⁻¹). Nas etapas subsequentes, os hidretos gerados foram removidos da fase aquosa e, posteriormente, aprisionados no tubo imerso em nitrogênio líquido.

As etapas de pré-aquecimento e volatilização das espécies aprisionadas, etapas 3 e 4 (Tabela 3), respectivamente, foram feitas através do aquecimento das paredes externas do tubo utilizando uma resistência elétrica conectada a uma fonte externa. A etapa de aquecimento do tubo foi interrompida durante aproximadamente 8 s, na etapa 5, para obter uma melhor resolução entre as espécies de DMA e TMAO. Entretanto, a etapa de aquecimento foi restabelecida para a eluição total das espécies aprisionadas no interior do tubo. O aquecimento do tubo foi mantido na etapa 7 para remoção das espécies que, eventualmente, tenham ficado retidas no interior do tubo, mesmo que a obtenção dos sinais analíticos pelo equipamento já tenha sido encerrada (etapa de limpeza e remoção de água). Na etapa 8, o tubo foi novamente arrefecido em nitrogênio líquido para ser utilizado na etapa de aprisionamento em uma nova leitura.

3.7. PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR HG-CT-AAS

3.7.1. Procedimento de extração empregando H_3PO_4

Para a extração seletiva dos compostos de As na suspensão de material biológico estudada, foi utilizado um procedimento baseado no emprego de ácido fosfórico diluído como meio extrator, conforme descrito na literatura.⁷⁵ Desta forma, a amostra foi transferida para um frasco de vidro com capacidade de 7,5 ml, tampa plástica rosqueada e septo de teflon (Supelco, EUA), cerca de 250 mg de uma suspensão 10% (m/v). Após, a adição de 3 ml de uma solução de ácido fosfórico 2 mol l⁻¹ e breve agitação manual, os frascos foram fechados e inseridos em um banho-maria por 12 h a uma temperatura de 90 °C. Após arrefecimento, foi aplicado o procedimento de neutralização com 650 µl de uma solução de NaOH 10 mol l⁻¹ com posterior ajuste à pH 6. Caso seja necessário, adição de NaOH 10 mol l⁻¹ ou adição de H_3PO_4 2 mol l⁻¹ podem ser empregados para o exato ajuste do pH. Para a determinação de TMAO(V) uma alíquota foi separada antes da adição de L-cisteína como pré-redutor. Para a determinação das demais espécies, L-cisteína 24% foi adicionada em volume necessário para que a concentração final na solução seja de

2% (m/v). Ensaios em branco foram preparados com os mesmos reagentes, e sofreram o mesmo tratamento acima.

3.7.2. Procedimento de extração empregando TMAH

A adição de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foi feita à suspensão de material biológico (fígado de frango) para avaliar o efeito da solubilização parcial do material particulado. Como mencionado anteriormente, a solução de TMAH atua mais especificamente na quebra de proteínas e, assim, o analito pode ser facilmente extraído para a solução. Desta forma, uma suspensão 10% (m/v) foi preparada em TMAH nas concentrações de 1, 2,5 e 5%. O tempo de contato da solução de TMAH com a suspensão, previamente a análise, foi também avaliado.

Todas as etapas envolvidas na análise de especiação de arsênio por diferentes técnicas analíticas, em amostra biológica e medicamento, estão mostradas na Figura 13.

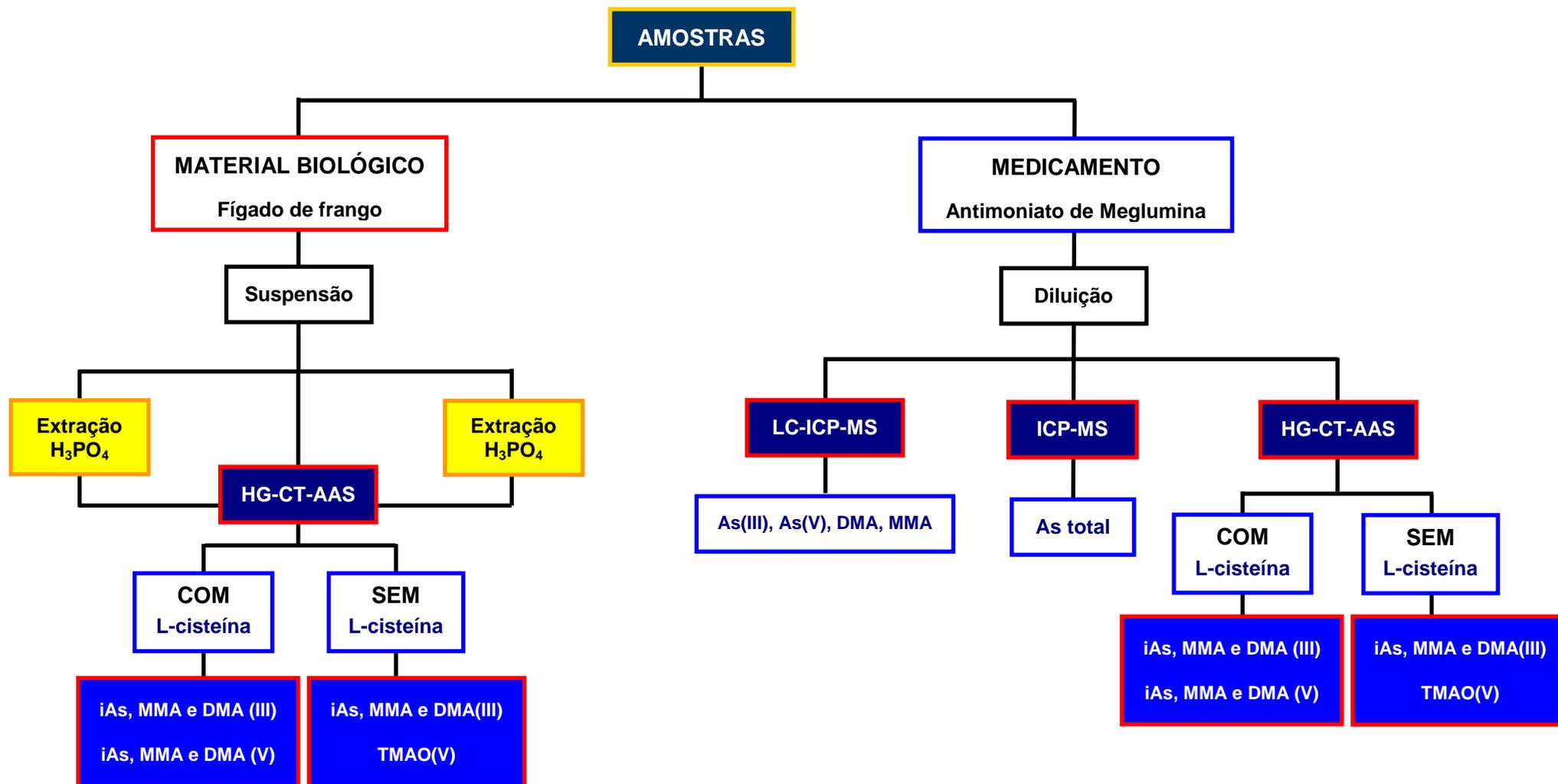


Figura 13. Etapas envolvidas na análise de especiação de arsênio em amostra biológica e de medicamento.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A apresentação e discussão dos resultados está dividida de acordo com a ordem previamente estabelecida na revisão bibliográfica. Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos para a análise de especiação de arsênio em material biológico empregando o procedimento de HG-CT-AAS com amostragem direta de suspensão. Na seqüência, o procedimento de HG-CT-AAS será aplicado para a análise de especiação no medicamento injetável antimoniato de meglumina. Cabe ressaltar que os resultados obtidos por HG-CT-AAS serão, posteriormente, comparados com os resultados obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS.

Na terceira parte, será feita uma comparação dos procedimentos e técnicas utilizadas neste trabalho para a análise de especiação de As, baseada nas figuras de mérito.

4.1. PREPARO DO SISTEMA DE HG-CT-AAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO

A primeira etapa deste trabalho consistiu na montagem do sistema de HG-CT-AAS para a análise de especiação de As. Após a montagem do tubo em “U” utilizado no procedimento de aprisionamento criogênico (item 3.5.3, *Materiais e Métodos*), foram feitos estudos preliminares para avaliar a sensibilidade e resolução de separação entre as espécies de As. Para isso, foi utilizada uma solução de referência na concentração de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ contendo as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO. Desta forma, 0,5 ml da solução de referência foram injetadas e, conseqüentemente, houve a formação dos hidretos gerados a partir da reação com NaBH_4 para posterior retenção na etapa de aprisionamento criogênico, seguida da determinação de arsênio por AAS. Além disso, o aprisionamento criogênico foi controlado manualmente, pois o objetivo principal desta etapa foi somente avaliar o desempenho do sistema inicial. Cabe ressaltar que as condições iniciais aplicadas foram estabelecidas de acordo com Matousek *et al.*⁷⁵

A sensibilidade do procedimento estava em concordância com resultados anteriormente reportados para a determinação de As por HG-CT-AAS. Além disso, as condições iniciais estabelecidas foram adequadas para a obtenção de uma boa resolução de separação entre as espécies de As na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO. Na Figura 14 é mostrado o perfil do cromatograma obtido para a determinação de As na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO por HG-CT-AAS.

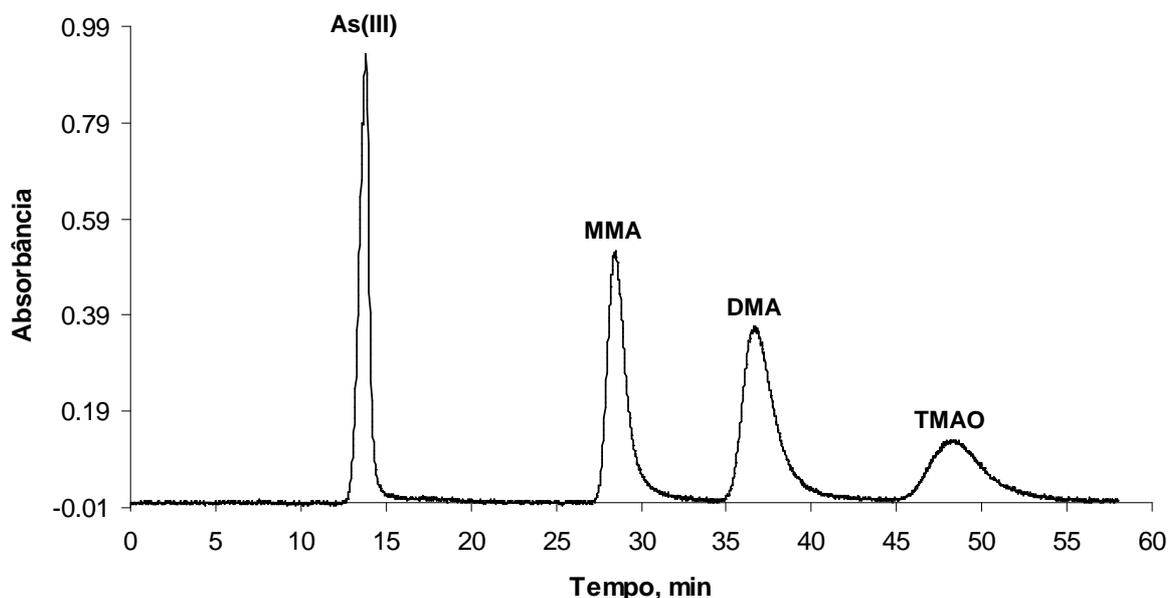


Figura 14. Separação das espécies de As obtidas após a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO.

Foi possível observar que, embora, a resolução entre as espécies de As estudadas seja adequada para a posterior quantificação, o emprego do controle manual da etapa de aprisionamento criogênico poderia promover deslocamentos nos tempos de retenção das espécies, de até 10 s, visto que podem ocorrer alterações no tempo de imersão ou remoção do tubo em “U” do nitrogênio líquido. Com o objetivo de minimizar este efeito, foi aplicado o procedimento automatizado por análise por injeção em fluxo (FIAS) para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS. Para este sistema, foi utilizado um frasco com parede dupla que serve como suporte para o tubo em “U”. O frasco, juntamente com o tubo, foi inserido em um recipiente térmico contendo nitrogênio líquido o qual foi conectado a uma válvula para controle da entrada e saída de nitrogênio durante os sucessivos ciclos de resfriamento e aquecimento.

Com o emprego do sistema automatizado não foram observadas variações no tempo de retenção das espécies desde que, o nível de nitrogênio líquido no interior do frasco seja sempre mantido constante. Foi observado que o nível de nitrogênio líquido deve ser restabelecido após três ciclos completos de leitura, para que assim, não ocorressem deslocamentos nos tempos de retenção das espécies. Com o

emprego do procedimento automatizado, a sensibilidade obtida para todas as espécies de As foi equivalente àquela observada com o uso do procedimento manual. Porém, a resolução entre as espécies de DMA e TMAO não foi adequada. Este fato foi associado à velocidade da taxa de aquecimento no sistema automatizado que é maior, quando comparada ao sistema manual. Como o ponto de ebulição das duas espécies é relativamente próximo, o controle da velocidade da taxa de aquecimento possui um papel fundamental na eficiência de separação. Contudo, no caso do uso do procedimento automatizado, a parede mais externa do frasco de vidro permanece em contato com o nitrogênio líquido. Assim, valores mais elevados de corrente elétrica foram necessários para que a temperatura atingida fosse adequada para a volatilização de todas as espécies. Com isso, a velocidade de aquecimento é muito rápida, sendo então, impossível efetuar a separação adequada das duas espécies.

Em contrapartida, a resolução obtida entre o DMA e TMAO empregando o procedimento manual foi adequada, visto que o tubo utilizado durante a etapa de aprisionamento foi totalmente removido do frasco contendo nitrogênio líquido. Desta forma, foi possível empregar um valor de corrente elétrica mais moderado na etapa de aquecimento, resultando em um melhor controle da velocidade de aquecimento.

Na tentativa de reduzir a velocidade da taxa aquecimento foram aplicados valores mais baixos de corrente elétrica para o aquecimento da resistência. Contudo, foi observado o fenômeno de alargamento de sinais para todas as espécies resultando na sobreposição de sinais e conseqüente baixa eficiência de separação.

Outra alternativa avaliada, foi o emprego de um agente silanizador à base de 1,1,1-trimetilsilano no sentido de evitar perdas por adsorção, reduzir os efeitos de alargamento de sinais e, também, melhorar a sensibilidade. Desta forma, a etapa de pré-tratamento do tubo foi feita com 4 injeções sucessivas de 25 μ l, da solução do agente silanizador, efetuadas juntamente com o gás carreador por pelo menos 4 h antes da análise. Contudo, resultados não satisfatórios foram obtidos para a resolução dos sinais entre as espécies de DMA e TMAO.

Modificações no tempo das etapas de controle do programa FIAS foram feitas para atingir uma melhor resolução, mas não foram observados melhores resultados. Nas Figuras 15 e 16, pode ser observada a baixa eficiência de separação entre as espécies de DMA e TMAO para o emprego do procedimento automatizado de HG-

CT-AAS, variando a voltagem e a corrente na etapa de aquecimento, e os tempos das etapas 4 e 6 do programa FIAS.

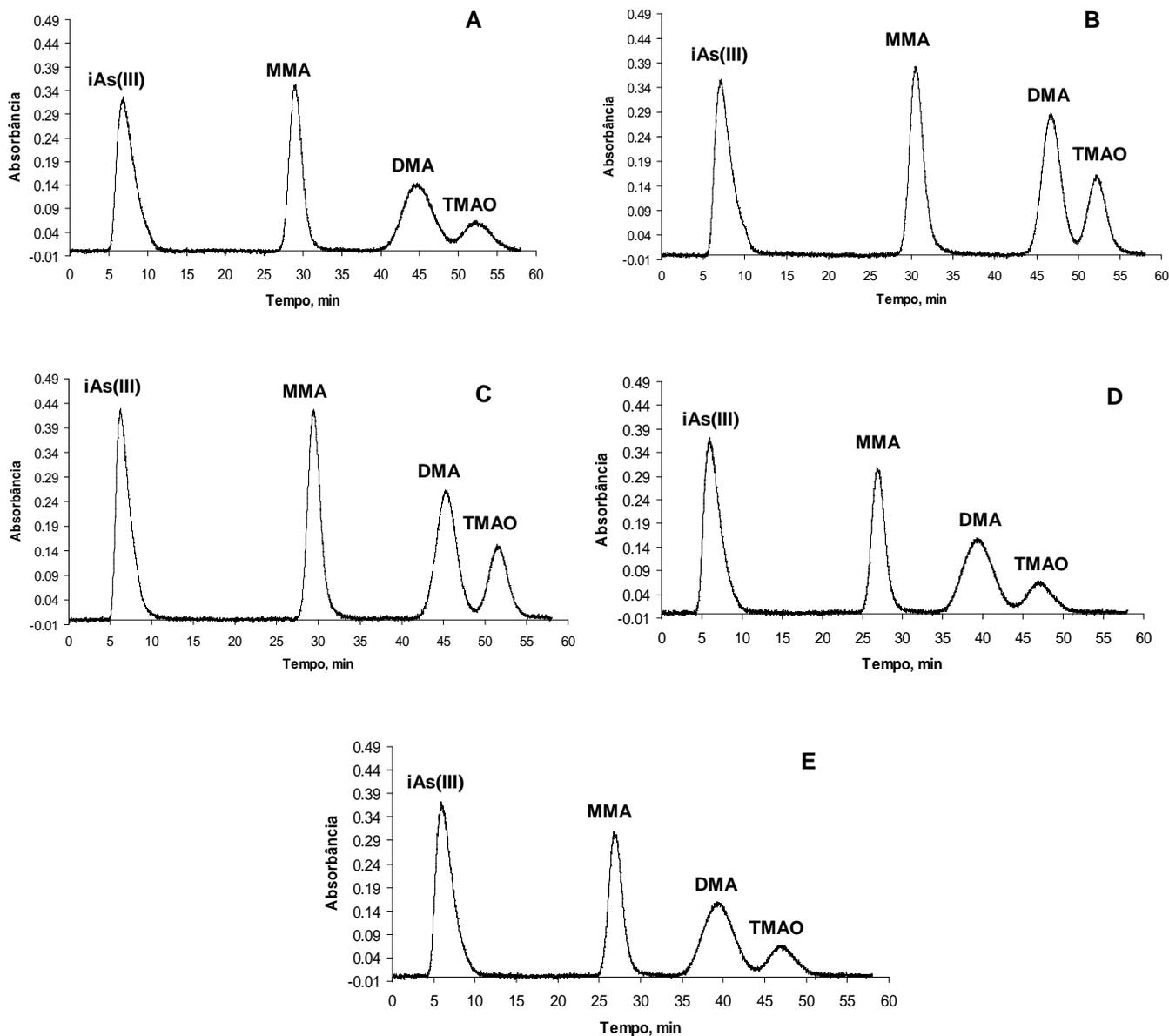


Figura 15. Cromatogramas obtidos para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO. Legenda: **A)** 2,2 A, 35,5 V, FIAS etapa 4 - 26 s, FIAS etapa 6 - 25 s; **B)** 2,3 A, 36,0 V, FIAS etapa 4 - 23 s, FIAS etapa 6 - 28 s; **C)** 2,3 A, 36,0 V, FIAS etapa 4 - 24 s, FIAS etapa 6 - 27 s; **D)** 2,3 A, 36,0 V, FIAS etapa 4 - 25 s, FIAS etapa 6 - 26 s; **E)** 2,3 A, 36,0 V, FIAS etapa 4 - 26 s, FIAS etapa 6 - 25 s.

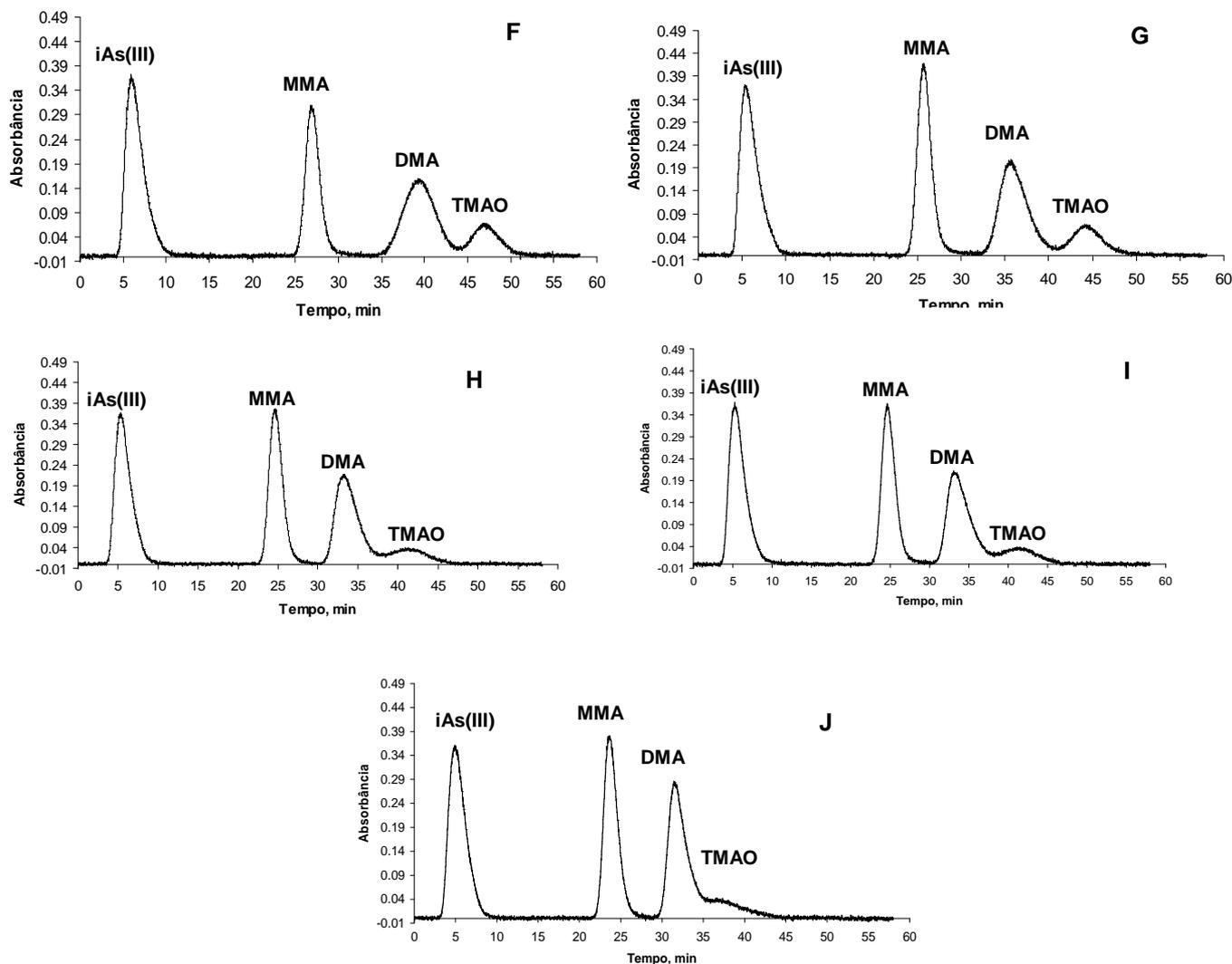


Figura 16. Cromatogramas obtidos para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração $2 \mu\text{g l}^{-1}$ para as espécies de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO. Legenda: **F)** 2,2 A, 35,5 V, FIAS etapa 4 - 26 s, FIAS etapa 6 - 25 s; **G)** 2,3 A, 37,0 V, FIAS etapa 4 - 26 s, FIAS etapa 6 - 25 s; **H)** 2,4 A, 37,5 V, FIAS etapa 4 - 26 s; etapa 6 - 25 s; **I)** 2,4 A, 37,5 V, FIAS etapa 4 - 26 s; etapa 6 - 25 s; **J)** 2,4 A, 38,0 V, FIAS etapa 4 - 26 s; etapa 6 - 25 s.

Pode-se observar uma redução significativa do sinal analítico do TMAO ao longo das determinações para a otimização dos parâmetros relacionados à eficiência de separação das espécies de As. Este comportamento foi devido o emprego da etapa de pré-redução com L-cisteína. Nesta etapa, o TMAO é reduzido a trimetilarsina e perdas por volatilização são observadas. Desta forma, a

absorbância integrada para a leitura contínua de uma solução de referência de TMAO na presença de L-cisteína reduz significativamente à medida que um maior tempo de repouso seja fornecido para que a reação se processe. Cabe destacar que a redução do sinal do TMAO neste trabalho foi concordante com dados reportados na literatura, onde a redução do sinal em até 60% foi observada com a adição de L-cisteína.^{75,119}

Durante os ensaios para a determinação de As por HG-CT-AAS foi obtida uma baixa eficiência de separação entre as espécies de DMA e TMAO. Adicionalmente, foi verificado que o tubo de vidro inicialmente empregado na etapa de aprisionamento criogênico não resistiu aos sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento. Desta forma, outro tubo, também de vidro e com as mesmas dimensões (item 3.5.3, *Materiais e Métodos*) foi, novamente, preparado para que pudesse ser utilizado nos ensaios posteriores para a determinação de As. Novamente, foi feita a comparação da sensibilidade e eficiência de separação para o tubo novo de acordo com resultados obtidos anteriormente e os valores de sensibilidade foram semelhantes.

Esta sequência de atividades executadas para o preparo de um tubo novo e verificação da eficiência de separação e sensibilidade, foi efetuada três vezes consecutivas e foi concluído que, embora existam trabalhos descritos na literatura utilizando tubos de vidro na etapa de aprisionamento criogênico foi verificado que este material não apresentava uma boa resistência térmica para suportar os sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento. Para tentar solucionar a baixa eficiência de separação das espécies e ainda o problema da baixa resistência do material aos sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento, foi desenvolvido um modelo de tubo em “U” feito de quartzo com largura de 24 mm (item 3.5.3, *Materiais e Métodos*). A redução da largura foi efetuada para reduzir a proximidade do tubo em “U” das paredes do frasco de vidro, e com isso, aplicar uma menor corrente elétrica durante a etapa de aquecimento e também diminuir a velocidade da taxa de aquecimento. Com estas modificações a eficiência de separação entre as espécies de DMA e TMAO foi adequada. Cabe destacar que, previamente ao uso, o tubo foi tratado com o agente silanizador. A Figura 17 mostra o cromatograma obtido com uma elevada eficiência de separação para as espécies de As avaliadas.

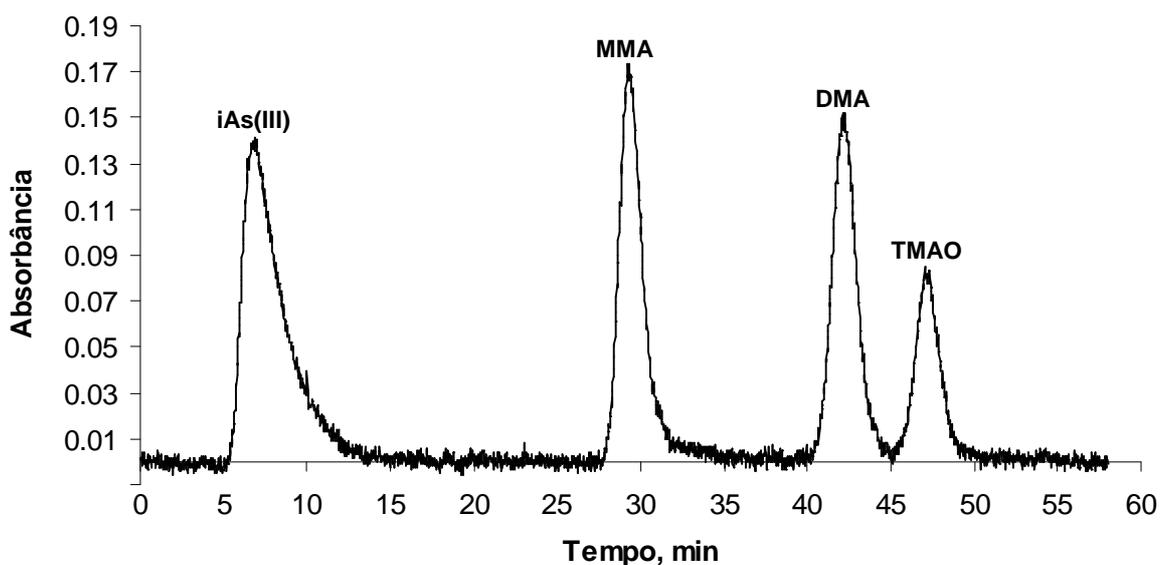


Figura 17. Cromatograma obtido para a injeção de 0,5 ml da solução de referência de As na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO empregando o procedimento automatizado de HG-CT-AAS.

Devido ao reduzido diâmetro interno do tubo (2,5 mm) foi observada maior retenção de vapor de água. Este fato é concordante com estudos mostrados na literatura onde, para reduzir a formação de água no tubo, o diâmetro deste foi aumentado. Entretanto, esta prática, geralmente, piora a separação das espécies.³⁴ Para a remoção de água e/ou de compostos que, por acaso, possam ter ficado retidos no interior do tubo, mesmo após a detecção, foi aplicada uma etapa de limpeza com o emprego do aquecimento da resistência por 60 s. Porém, o procedimento automatizado dificulta a eliminação da água retida, visto que o tubo permanece imerso no frasco com nitrogênio líquido e, assim, a temperatura necessária para a remoção do vapor de água não é atingida. Foi verificado que ao final de 10 a 12 ciclos para a determinação de As o tubo foi bloqueado pela formação de gelo no seu interior. Desta forma, foi necessário avaliar uma alternativa para reter o vapor de água no separador gás-líquido e evitar o bloqueamento do tubo, conforme será descrito a seguir.

4.1.1. Avaliação do resfriamento do separador gás-líquido

Foi avaliado o emprego de banho de gelo no GLS para promover a retenção do vapor de água. Este estudo foi necessário visto que, geralmente, após dez determinações o tubo em “U” era bloqueado pela formação de gelo. Isto ocorria mesmo que a adição da mistura reacional fosse feita diretamente na parede do frasco, de maneira a minimizar a formação do spray de vapor de água no interior do GLS. Após a formação de gelo foi necessário remover o tubo do interior do frasco com nitrogênio líquido e aguardar de 1 a 2 h para que o gelo fosse removido e o tubo pudesse ser novamente utilizado. O emprego da etapa de aquecimento para a remoção do gelo formado não é recomendado, visto que o emprego desta etapa, sem a utilização do gás carreador, promove o superaquecimento da fase estacionária e, conseqüentemente, a remoção do agente silanizador. Desta forma, após a remoção do gelo e inserção do tubo em nitrogênio líquido, foi verificado que a eficiência de separação das espécies de As era reduzida. Assim, foi necessário aplicar uma nova etapa de pré-tratamento do tubo para que a eficiência de separação fosse restabelecida. Portanto, ao avaliar o tempo para que o tubo fosse fechado pela formação de gelo em seu interior (em torno de dez determinações - 2 h) e o tempo necessário para que o tubo fosse desbloqueado (2 h), ficou evidente à necessidade de empregar uma alternativa para a remoção e/ou retenção do vapor de água.

Neste sentido, foi estudado o emprego de membranas para a remoção de água. Contudo, o emprego de membranas Nafion[®] já havia sido avaliado em outros trabalhos reportados na literatura. Segundo os pesquisadores, este tipo de membrana foi eficiente para a remoção de água. No entanto, foi observado uma retenção significativa (10 a 15%), principalmente, de espécies orgânicas de As (DMA, MMA e TMAO).⁹⁶

Outra alternativa avaliada foi o emprego de um banho de gelo para reduzir a temperatura no interior do GLS e, por conseqüência, reduzir a pressão parcial da água e eliminar a formação de gelo. Dados reportados na literatura revelaram que a redução da temperatura de 20 para 0 °C reduz, conseqüentemente, a pressão parcial da água de 17,5 para 4,6 mm Hg, respectivamente.⁹⁶ Com o emprego de banho de gelo foi observada maior retenção de vapor de água nas paredes do GLS. Contudo, como a temperatura no interior do GLS foi reduzida, foi necessário avaliar

se ocorreu retenção das espécies de As por condensação, principalmente, para MMA, DMA e TMAO que possuem temperaturas de ebulição de 2, 35 e 70 °C, respectivamente.

Para verificar se ocorriam perdas das espécies de As, foi feita a medição da temperatura no interior do GLS com o uso de um termopar. A temperatura após etapa de remoção dos hidretos da solução (etapa 2 do programa FIAS) foi de 13,5, 4,8 e 1,6 °C no interior da solução, na interface da solução com o ar e no topo do GLS (gás carreador), respectivamente. Os resultados obtidos para a análise da solução de referência de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO na concentração de 1, 2, 2, 2 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de absorvância integrada para a solução de referência de As(III) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO para avaliação do emprego do banho de gelo no GLS.

Absorvância integrada, s			
Sem banho de gelo			
As(III)	MMA	DMA	TMAO*
0,45 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,95 ± 0,01
Com banho de gelo			
As(III)	MMA	DMA	TMAO*
0,41 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,94 ± 0,01

* Determinação sem o uso da etapa pré-redução.

Embora, a avaliação do emprego do banho de gelo tenha sido, inicialmente, voltada para as espécies orgânicas de As, os resultados obtidos mostraram que estas espécies não foram influenciadas pelo uso do banho de gelo no GLS, visto que os resultados obtidos de absorvância integrada são muito semelhantes nos dois casos. Por outro lado, a sensibilidade para o As(III) foi reduzida em cerca de 9% com o uso de banho de gelo no GLS. Primeiramente, os resultados obtidos não foram concordantes com as observações práticas, visto que sem o emprego do banho de gelo no GLS havia formação de gotículas de água no tubo que, conduz as espécies voláteis até o atomizador e, assim, possivelmente retém a arsina nestas gotículas em razão da sua elevada solubilidade. Contudo, foi observado que os resultados foram relativamente menores para o emprego do banho de gelo no GLS,

mesmo que a presença de gotículas não tenha sido observada no tubo que conduz as espécies até o atomizador. Neste caso, a elevada quantidade de hidrogênio utilizada como gás carreador contribuiu para que a arsina se mantivesse na fase gasosa. Por outro lado, a redução dos resultados para o emprego do banho de gelo no GLS pode ser explicada em razão da elevada solubilidade da arsina ($0,7 \text{ mg ml}^{-1}$) sendo, portanto, mais difícil a sua remoção da solução aquosa à baixa temperatura. No sentido de avaliar se há diferença estatística entre os resultados obtidos, os dados foram analisados empregando o suplemento de ferramentas de análise do *software* Excel. O resultado para a análise dos dados obtidos para a determinação de As na forma inorgânica com e sem o emprego de gelo no separador gás-líquido apresentam uma diferença estatística, visto que o valor do *t*-estatístico (12,65), para o nível de confiança de 95% foi superior ao valor do *t*-crítico bi-caudal (2,78). Embora tenha sido observada uma pequena diferença na sensibilidade da AsH_3 , o emprego do banho de gelo no GLS foi necessário, visto que houve a redução significativa da transferência de vapor de água para o tubo em “U”. Desta forma, evitou-se o bloqueio do tubo e, assim, foi possível utilizar o procedimento de HG-CT-AAS sem limitações quanto ao número de ciclos efetuados.

4.1.2. Avaliação da exatidão do procedimento de HG-CT-AAS

Após a montagem do sistema de HG-CT-AAS foi feita a avaliação da sensibilidade, da eficiência de separação das espécies e remoção de vapor de água. Para a avaliação da exatidão, os resultados obtidos para a determinação de As por HG-CT-AAS foram comparados com os valores certificados para a concentração total de As em CRMs. Neste sentido, três amostras de água certificadas com constituições diferentes foram empregadas para a determinação de As por HG-CT-AAS. Embora, a matriz do material biológico não seja semelhante a matriz dos CRMs, a avaliação da exatidão do procedimento para a determinação das demais espécies de As foi efetuada, visto que o resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os resultados obtidos em um trabalho anterior para a determinação de As nos mesmos CRMs por HG-CT-AAS. A única modificação efetuada no sistema foi a substituição da alça de amostragem com capacidade de 0,5 ml por uma alça de 2 ml. Esta modificação foi necessária para aumentar o limite de

detecção, visto que algumas espécies de As encontram-se em concentrações muito baixas. Cabe ressaltar que foi necessário aplicar o procedimento de calibração para cada uma das espécies individualmente, visto que a sensibilidade das espécies de MMA e DMA é cerca de 10% inferior quando comparada à sensibilidade do As na forma inorgânica. Este fato pode estar relacionado à menor estabilidade do complexo formado entre a L-cisteína e as espécies orgânicas de As, a menor cinética de pré-redução para as espécies orgânicas e a dificuldade de remoção da espécie formada da solução aquosa (diferença de solubilidade).^{56,57,58,119} Adicionalmente, a calibração para a determinação de As na forma de TMAO foi efetuada sem a adição de L-cisteína, para que as perdas por volatilização fossem evitadas. Na Tabela 4 são mostrados os resultados obtidos para a determinação de As por HG-CT-AAS nos CRMs utilizados para a avaliação da exatidão do procedimento.

Tabela 4. Avaliação da exatidão do procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS.

CRMs	Concentração, ng l ⁻¹				Concentração, µg l ⁻¹		Concordância, %
	iAs	MMA	DMA	TMAO	As total	Valor certif.	
CASS-4*	1066 ± 31	11,0 ± 1,7	100 ± 3	< 18	1,20	1,11 ± 0,16	108
NASS-5*	1144 ± 16	< LOD	48,0 ± 1,1	< 18	1,21	1,27 ± 0,12	95
SLRS-4*	521 ± 13	45,3 ± 1,1	90,2 ± 1,3	62,8 ± 1,9	0,72	0,68 ± 0,06	105
LOD*	21	3	5	10			
LQ*	70	10	18	34			
CASS-4**	1056 ± 19	9,9 ± 0,8	92,3 ± 4,2	28,2 ± 2,5	1,19 ± 0,02	1,11 ± 0,16	107,2
NASS-5**	1108 ± 26	< LOD	45,5 ± 0,5	16,3 ± 1,9	1,17 ± 0,03	1,27 ± 0,12	92,5
SLRS-4**	467 ± 11	44,6 ± 1,7	81,3 ± 2,7	59,1 ± 2,9	0,65 ± 0,01	0,68 ± 0,06	95,6
LOD** (n = 10)	26,0	9,5	6,2	5,3			
LOQ** (n = 10)	41,9	30,1	19,1	15,6			
Coeficiente angular	1,4021	1,2936	1,465	1,3801			
R ²	0,9894	0,9993	0,9998	0,9935			

* Resultados não publicados, apresentação oral em congresso internacional (adaptado de Matousek, T.)

** Resultados obtidos neste trabalho (n = 3)

Foi observado que os resultados foram concordantes com os valores certificados para o teor de As total nos CRMs utilizados. Adicionalmente, os resultados também foram concordantes com as análises efetuadas previamente nos CRMs empregando o mesmo procedimento.

4.2. EMPREGO DO PROCEDIMENTO DE HG-CT-AAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As EM MATERIAL BIOLÓGICO POR AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO

Após a montagem e verificação do desempenho do sistema, o procedimento de HG-CT-AAS foi aplicado para a análise de especiação de As em material biológico por amostragem direta de suspensão. Neste sentido, este trabalho propõe o emprego do acoplamento do aprisionamento criogênico com fase estacionária, como técnica de separação, com a posterior determinação de As por HG-AAS. Acidentalmente, o emprego da HG permite a determinação seletiva das espécies de As(III) e As(V) na amostra. A maioria das espécies de As(III) é oxidada em um reduzido espaço de tempo, principalmente, se uma etapa prévia de tratamento da amostra é aplicada. Por isso, o emprego da amostragem direta de suspensão reduz a probabilidade de ocorrência destes processos de interconversão.

4.2.1. Otimização do procedimento de HG-CT-AAS

As suspensões de material biológico (fígado de frango) foram preparadas previamente à análise conforme descrito no item 3.4.1 (Materiais e Métodos). Os primeiros ensaios foram feitos empregando uma suspensão na concentração de 10% (m/v), e foi verificada uma elevada formação de espuma no meio reacional. Por este motivo, foi feita a adição de uma solução com concentração conhecida de As(III) na forma inorgânica para avaliar se a espuma formada poderia estar retendo as espécies voláteis formadas a partir da reação com o NaBH_4 e, assim, impedindo que as mesmas fossem detectadas. Os resultados obtidos mostraram que as recuperações não foram quantitativas.

No sentido de reduzir a formação de espuma, o emprego de um agente anti-espumante (anti-espumante B, Sigma) na solução de NaBH₄ foi avaliado. A concentração de anti-espumante avaliada foi de 0,5, 1 e 1,5% (m/v), conforme uso prévio em outros trabalhos.^{33,90,133} A redução de espuma somente foi significativa para as concentrações de 1 e 1,5%. Porém, não houve diferença significativa (avaliação visual) na redução da quantidade de espuma formada para o emprego da concentração de 1,5% em comparação com 1%. Desta forma, para os ensaios subsequentes o agente anti-espumante foi adicionado à solução de NaBH₄ na concentração de 1%.

Durante as análises foi observado elevado desvio padrão relativo (RSD) para as determinações de As empregando a amostragem direta de suspensão, sendo que estes foram associados ao processo de decantação das partículas sólidas na suspensão. Mesmo empregando uma etapa de agitação da suspensão com o uso de uma barra magnética, previamente a análise, as medidas de absorbância integrada foram bastante dispersas. Assim, foi feita a adição de um tensoativo (Triton X-100) previamente à aferição final da suspensão, onde sua concentração foi avaliada de 0,25, 0,5 e 1% (m/v). Uma condição de compromisso foi obtida com a adição de 0,5% de Triton X-100 no volume final da suspensão, visto que elevadas concentrações promovem a formação de espuma durante a mistura reacional e a concentração de 0,25% não foi efetiva na redução dos valores de RSD durante as análises efetuadas. Mesmo com a otimização da concentração do anti-espumante e do tensoativo os valores das recuperações obtidas não foram superiores a 70%.

Foi avaliado o efeito da concentração da solução de NaBH₄ na obtenção dos dados em absorção integrada para a determinação de As na amostra de material biológico na forma de suspensão. Para isso, soluções na concentração de 1, 2 e 3 (m/v) foram utilizadas. Cabe ressaltar que, para todas as concentrações de NaBH₄ estudadas foi feita à adição da solução anti-espumante na concentração final de 1% (m/v). Para a determinação de As na suspensão 10% (m/v), preparada em Triton 0,5% (m/v), os resultados obtidos de absorbância integrada foram semelhantes para o emprego da solução de NaBH₄ na concentração de 1, 2 e 3%. Contudo, o valor de RSD obtido foi superior a 8% com o emprego da solução de NaBH₄ na concentração de 3%. Enquanto que, para a solução de NaBH₄ na concentração de 1 ou 2% os valores de RSD não foram superiores a 3%. Este fato pode estar associado a maior

formação de espuma observada com o emprego da solução de NaBH_4 em maior concentração.

4.2.2. Ensaios de recuperação empregando o procedimento de análise de especiação de As em material biológico por HG-CT-AAS

Os testes iniciais para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS em material biológico mostraram que a concentração de As nas amostras de fígado de frango era muito baixa. Foi necessário, então, utilizar uma massa de amostra maior durante o preparo da suspensão. Assim verificou-se inicialmente, a possibilidade de aplicar o procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS em uma suspensão na concentração de 20% (m/v). Contudo, mesmo com a adição do agente anti-espumante foi observada a formação de espuma no interior dos capilares e do GLS. Cabe destacar que, apenas para a suspensão na concentração de 5%, a formação de espuma não foi intensa, sendo dispersa em poucos segundos.

Para a avaliação da interferência da presença de espuma no uso de suspensões com concentração de 20% (m/v), foram feitas adições da solução de referência de As com concentração conhecida de As(III) na forma inorgânica, MMA e DMA. Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação foram de $66,3 \pm 1,6$; $70,2 \pm 2,2$; $68,7 \pm 1,8\%$, para as espécies de As(III), MMA e DMA, respectivamente. De acordo com os resultados observados a atuação da interferência ocorre de maneira uniforme independentemente da espécie de As avaliada. Mesmo que a determinação de As não tenha sido possível utilizando suspensão com concentrações inferiores a 20%, visto que o teor de As na amostra é muito baixo, suspensões com concentrações de 5 e 10% (m/v) foram preparadas para posterior avaliação. Apesar do emprego de menores concentrações de suspensão, os valores obtidos para os ensaios de recuperação não permitem que o procedimento seja aplicado para a análise de especiação de As.

Ainda, no sentido de eliminar a formação de espuma durante as análises para a determinação de As empregando a amostragem direta de suspensão, o desenvolvimento de um novo separador gás-líquido foi avaliado, visto que a intensa formação de espuma ocorre, principalmente, durante a mistura do gás carreador

com os demais reagentes na confluência em forma de “T” (Figura 12, *Materiais e Métodos*). Desta forma, foi desenvolvido um GLS com uma entrada adicional na tampa superior, para que assim, o gás carreador fosse introduzido no GLS sem necessariamente, entrar em contato com a mistura reacional. Utilizando o novo separador gás-líquido foi observada a ausência de formação de espuma na presença do agente anti-espumante adicionado à solução de NaBH_4 . Portanto, este novo modelo de GLS foi escolhido para estudos posteriores.

A seguir, foi feita a adição de uma solução de referência às amostras (suspensão a 20%, m/v) para verificar se os baixos teores de recuperação obtidos anteriormente estavam relacionados com a retenção das espécies no GLS por ação da espuma formada. Contudo, os resultados obtidos não foram satisfatórios e, então, pode-se concluir que a baixa eficiência de recuperação para os ensaios efetuados não estava relacionada à interferência causada pela formação de espuma durante a reação de redução com posterior formação das espécies voláteis. A única diferença observada devido a modificação efetuada no GLS foi relacionada ao menor desvio padrão obtido para os ensaios de recuperação. Com isso, as recuperações para As(III) na forma inorgânica foram de $72,7 \pm 4,4$ e $71,6 \pm 2,3\%$ para o uso do GLS sem e com a entrada adicional do gás carreador, respectivamente.

Com o objetivo de verificar a influência do tempo fornecido para a liberação dos hidretos da solução foi feita a modificação deste parâmetro (etapa 2 programa FIAS). Pois de acordo com as observações visuais, mesmo com o emprego do novo modelo de GLS uma pequena quantidade de espuma ainda era formada. Contudo, uma avaliação mais detalhada não pode ser feita, visto que o *software* delimita as modificações efetuadas no programa FIAS. Desta forma, o tempo da etapa 2, inicialmente, 90 s foi modificado para 180 s. Porém, não houve alterações para os valores obtidos, frente aos resultados anteriormente alcançados, com os ensaios de recuperação.

Para verificar se a baixa eficiência de recuperação ocorria devido à interferência em fase gasosa ou em fase líquida, foram efetuados ensaios de recuperação durante a etapa de aprisionamento criogênico. Para isso, o programa FIAS foi modificado para que a volatilização das espécies retidas durante a etapa de pré-concentração não fosse aplicada. Inicialmente, foi feita a injeção de 0,5 ml de uma suspensão na concentração de 10% (m/v) e, assim, as espécies de As

presentes na amostra permaneceram retidas no interior do tubo em “U”. Em seguida, foi feita a análise de em uma solução de referência e, para isso, o ciclo completo do programa FIAS foi aplicado. Desta forma, o sinal obtido foi de acordo com o teor de As presente na suspensão 10% (m/v) e na solução de referência.

O mesmo procedimento foi aplicado em ordem inversa, no sentido de avaliar, inicialmente, a retenção das espécies presentes na solução de referência e, em seguida, a determinação de As na suspensão 10% (m/v) empregando o ciclo completo do programa FIAS. Recuperações superiores a 95% foram obtidas para ambos os procedimentos. Ou seja, foi observado que a ordem de leitura não é um fator crucial para que recuperações quantitativas fossem alcançadas. Desta forma, os resultados obtidos indicam que a interferência observada sob os ensaios de recuperação de As em amostras biológicas é, possivelmente, em fase líquida. Entretanto, não foi possível identificar se a interferência em fase líquida foi causada por íons dissolvidos, retenção dos hidretos na superfície do material particulado ou pela baixa eficiência de ataque do redutor ao analito ligado, principalmente, à proteínas presentes em amostras biológicas (interação com o enxofre presente nas proteínas).

Embora os resultados obtidos não sejam favoráveis para o emprego do procedimento de análise de especiação de As com amostragem direta de suspensão, os LODs alcançados foram: 0,09; 0,03; 0,04; 0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as espécies de iAs, MMA, DMA e TMAO, respectivamente.

4.2.3. Emprego da extração seletiva de compostos de As com H_3PO_4

Foi avaliado o procedimento de extração seletiva dos compostos de As com o emprego de H_3PO_4 1 mol l^{-1} . O procedimento de extração foi feito para verificar a presença de compostos de As na amostra de fígado de frango, visto que os resultados até aqui obtidos, com o emprego da amostragem direta de suspensão, foram menores que os limites de detecção para o procedimento de HG-CT-AAS. A baixa concentração de As no tecido biológico foi ratificada, já que os resultados obtidos com o emprego do procedimento de extração seletiva foram, também, menores que o LOD alcançado. Cabe destacar que os LODs obtidos para as espécies de As não foram adequados, visto que após a etapa de extração foi

efetuada uma etapa de neutralização com NaOH ou KOH 10 mol l⁻¹. É sabido que o uso destes reagentes prejudica o LOD, pois os valores para os brancos são, geralmente, elevados. O teor dos brancos para os ensaios de extração foram cerca de três vezes superiores aos brancos obtidos quando o procedimento no modo convencional foi empregado. Adicionalmente, a solução de KOH foi escolhida para ser utilizada na etapa de neutralização, dado que os valores dos brancos foram um pouco menores quando comparados aos valores obtidos para o uso de NaOH.

O procedimento de extração também foi aplicado para uma amostra de CRM de tecido de ostra, embora seja sabido que os materiais biológicos de origem marinha possuem elevada concentração de arsenobetaina e que esta espécie não gera hidretos voláteis. Como a molécula de AsB possui uma elevada estabilidade e, assim, não é decomposta em temperaturas inferiores a 300 °C, acredita-se que a recuperação de As (aproximadamente 47%) não tenha sido equivalente ao valor de referência devido à possível presença de AsB na amostra, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da exatidão do procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS em amostras biológicas após o emprego do procedimento de extração.

Amostra	Concentração, µg g ⁻¹ (n = 3)				
	As	MMA	DMA	TMAO	As total
Suspensão 10%	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
CRM (NBS 1566)*	< LOD	0,13 ± 0,01	6,21 ± 0,12	< LOD	6,34 ± 0,12
LOD**	0,17	0,04	0,19	0,06	
LOQ**	0,37	0,12	0,58	0,18	

* Valor certificado para a concentração de As total no CRM 13,4 ± 1,9 µg g⁻¹.

** Valor calculado com base em 10 leituras do branco.

Anteriormente à determinação das amostras e à calibração do instrumento, foram feitos ensaios de recuperação na presença de H₃PO₄ e KOH, visto que modificações nas condições reacionais poderiam alterar a sensibilidade do procedimento. Portanto, ensaios de recuperação com a adição de uma solução de referência de As foram efetuados nos brancos e foi verificado que a presença de H₃PO₄ e KOH não promoveu modificações na mistura reacional, de maneira que a mudança de sensibilidade não foi observada.

4.2.4. Emprego da solução de hidróxido de tetrametilamônio no preparo de suspensão de material biológico (fígado de frango)

De acordo com os resultados obtidos para os ensaios de recuperação de As o emprego do procedimento da análise de especiação de As em material biológico com amostragem direta de suspensão por HG-CT-AAS não foi adequado. Neste sentido, foi estudada uma maneira de promover a dissolução parcial das partículas sólidas em suspensão de maneira a manter a integridade das espécies de As na amostra. Uma recente revisão reporta o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para promover, principalmente, a quebra de proteínas em diferentes tipos de amostras e com isso permitir que o analito permaneça livre em solução.⁹² A maioria dos trabalhos na literatura emprega uma etapa de extração (ácidos concentrados, energia micro-ondas e ultrassom), previamente, a detecção da amostra introduzida na forma de suspensão. Neste sentido, foi avaliado o emprego de uma solução de TMAH no preparo da suspensão. De certa forma, o emprego da etapa de extração pode produzir melhores resultados. Por outro lado, é importante que as condições empregadas não provoquem a conversão ou degradação das diferentes espécies presentes na amostra.

Em seguida, foi feita a avaliação dos brancos e dos ensaios de recuperação em uma solução de TMAH 1% (v/v). Os valores dos brancos foram, relativamente, superiores quando comparados aos brancos sem adição de TMAH. Contudo, mudanças significativas no LOD não foram observadas. As recuperações na solução de TMAH 1% foram quantitativas (acima de 95%) para todas as espécies de As estudadas o que pressupõe que as condições reacionais não foram modificadas drasticamente. Ademais, como a solução de TMAH possui característica alcalina, a geração seletiva das espécies pode ser mantida.

Em seguida, foi feita a otimização do tempo de contato da amostra biológica com o TMAH. Para o uso de uma solução 1% (v/v) de TMAH não foram observadas mudanças significativas em relação ao tempo de contato com a amostra biológica. Cabe ressaltar que o tempo mínimo avaliado de contato com a amostra foi 30 min, anteriormente à análise, visto que este tempo foi aplicado para a etapa de pré-redução, e assim, a solução de TMAH e a L-cisteína foram adicionadas simultaneamente à amostra. Embora, os valores dos ensaios de recuperação

tenham sido superiores aos valores obtidos sem o emprego da solução de TMAH, recuperações inferiores a 80% não são suficientes para a implementação do procedimento como uma alternativa para a análise de especiação de As.

Na busca de melhores resultados, concentrações mais elevadas de TMAH, 2,5 e 5%, foram utilizadas com o objetivo de promover uma maior dissolução do material particulado e subsequente extração do analito para a solução. Contudo, para concentrações de 5% de TMAH, o tempo de contato com a amostra biológica foi um fator importante, visto que à medida que o tempo de contato aumenta foi observada a formação de um precipitado. Este fato pode ser explicado pela elevada concentração de enxofre em pH alcalino, o que promove a precipitação de compostos orgânicos sulfurados e/ou metais na forma de hidróxido.

Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação em diferentes concentrações de TMAH em relação ao tempo de contato com a amostra estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Recuperações obtidas para a determinação de As por HG-CT-AAS em material biológico por amostragem de suspensão (10%).

TMAH, %	Recuperação, %
1	64,4 ± 4,6
2,5	69,2 ± 3,2
5	75,4 ± 1,9
5 (tempo 0 min)	74,5 ± 2,6
5 (tempo 10 min)	72,3 ± 2,8
5 (tempo 20 min)	78,7 ± 1,9
5 (tempo 30 min)	76,6 ± 2,5
5 (tempo 40 min)	72,3 ± 3,2
5 (tempo 50 min)	69,1 ± 2,8
5 (tempo 60 min)	65,9 ± 2,3
5 (tempo 70 min)	63,8 ± 3,5

Mesmo para concentrações de TMAH superiores a 2,5% as recuperações obtidas não foram satisfatórias (aproximadamente 75%). Cabe ressaltar que o emprego da análise de especiação de As em material biológico com amostragem direta de suspensão não foi efetivo e, assim, o estudo da aplicação de outros reagentes para promover a extração do analito para a solução podem ser avaliados,

tendo em vista a minimização do risco de alterações das espécies de As. Embora diversos testes tenham sido feitos na tentativa de buscar alternativas para que o procedimento de análise de especiação por HG-CT-AAS com amostragem direta de suspensão fosse implementado como uma metodologia analítica alternativa para a análise de especiação de As, os resultados obtidos não permitem a sua aplicabilidade imediata. Entretanto, outros parâmetros podem ser estudados como, por exemplo, tamanho de partícula, emprego de solventes orgânicos e o uso de ultrassom e/ou micro-ondas.

4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As EM MEDICAMENTOS

O procedimento de análise de especificação de As por HG-CT-AAS foi aplicado em amostras do medicamento antimoniato de meglumina. Devido à elevada concentração de Sb presente na matriz deste medicamento todos os componentes do sistema, como o tubo em “U”, GLS e tubulações do sistema FIA foram utilizadas especificamente para esta finalidade e, assim, minimizar a possibilidade de interferência de Sb na análise de especificação de As em amostras com constituição diferente.

Os ensaios iniciais foram feitos empregando a etapa de aprisionamento criogênico de forma manual. Adicionalmente, soluções de calibração para as quatro espécies de As estudadas foram utilizadas para verificar a sensibilidade e a resolução obtidas. O sistema apresentou desempenho e resultados concordantes com aqueles obtidos, inicialmente, na montagem utilizada para as determinações de As em amostras biológicas.

Para os ensaios subsequentes, o controle manual da etapa de aprisionamento criogênico foi, ainda, empregado para a determinação de As em amostras de antimoniato de meglumina diluídas com água. Cabe ressaltar, que nenhuma modificação na vazão dos reagentes ou gases foi feita, visto que o procedimento já havia sido otimizado para as determinações de As em material biológico. Contudo, foi observada uma forte supressão do sinal analítico durante as determinações de As. Provavelmente, esta supressão tenha sido provocada pela deposição de Sb na superfície do material utilizado como fase estacionária, dos tubos de PTFE ou no atomizador de quartzo. Para avaliar, de forma mais detalhada, o efeito da supressão do sinal analítico de As, primeiramente, foi feita a determinação de As(III) na forma inorgânica, em uma solução de referência com concentração de As de $1 \mu\text{g l}^{-1}$. Em seguida, foi feita a determinação de As na amostra do medicamento de antimoniato de meglumina (diluição de 2000 vezes) e, após, a determinação de As foi feita, novamente, na mesma solução de referência utilizada inicialmente. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7. Estudo do efeito da supressão na absorvância integrada (s) para a solução de referência de As(III) na forma inorgânica em amostra de antimoniato de meglumina (diluição de 2000 vezes em água).

Absorvância integrada, s			
Replicata	Amostra	Solução de referência	
		Antes (A)	Depois (B)
1	0,44	0,43	0,21
2	0,25	0,43	0,22
3	0,27	0,42	0,25
4	ND	0,43	0,27
Média	0,32	0,43	0,24
SD	0,01	0,01	0,03
RSD (%)	32,8	1,2	10,8

Medição da absorvância integrada para a solução de referência de As(III) na forma inorgânica na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (A) antes da amostra e (B) após a amostra. ND = não determinado

Foi observado que os valores de absorvância integrada obtidos para a determinação de As na solução de referência, após as leituras da amostra do medicamento, foram, significativamente, reduzidos. Possivelmente, devido à elevada supressão de sinal. Em virtude da matriz do medicamento possuir elevada concentração de Sb(V), da ordem de 40 mg l^{-1} , após a diluição de 2000 vezes (aproximadamente 81000 mg ml^{-1} de Sb no medicamento *in natura*), a redução do sinal analítico foi associada aos fenômenos de adsorção do Sb nas paredes dos tubos de PTFE utilizados no sistema FIA, na superfície do quartzo do tubo em “U” e/ou atomizador. Desta forma, foi investigada a estabilização do sistema com repetitivas leituras da amostra até a saturação e conseqüente equilíbrio através da estabilização do sinal analítico. Para manter o sistema em equilíbrio, a leitura das amostras foi feita permanentemente entre as leituras de um ensaio em branco e uma solução de referência. A Figura 18 ilustra o perfil do sinal analítico para As na amostra de antimoniato de meglumina 2000 vezes diluída e seu respectivo sinal de fundo.

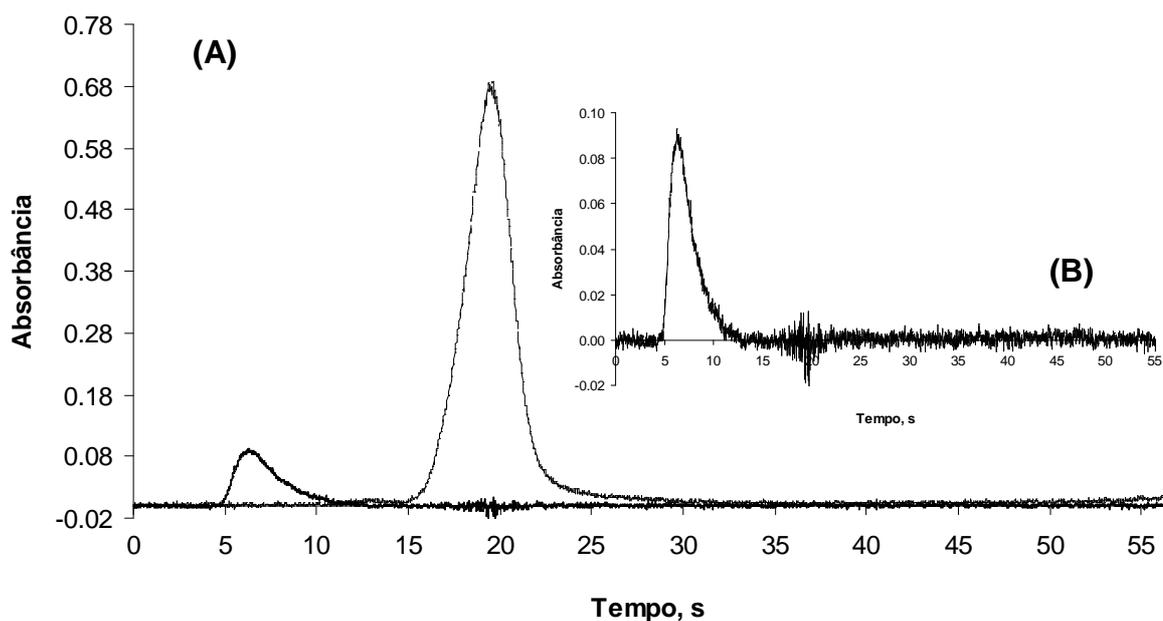


Figura 18. (A) Sinais obtidos para As na forma inorgânica no antimoniato de meglumina 2000 vezes diluído com água (linha contínua) e seu respectivo sinal de fundo (linha pontilhada). (B) Vista ampliada do sinal analítico para As na amostra de antimoniato de meglumina.

Conforme mostrado na Figura 18, foi observado que, mesmo ocorrendo uma supressão do sinal devido à presença de interferente, o sinal analítico obtido não indicou a presença de outras espécies metiladas de As, visto que apenas o sinal no tempo de retenção do As na forma inorgânica foi visualizado. Desta forma, estudos foram feitos na tentativa de aumentar o limite de tolerância da determinação de As, em função do interferente.

4.3.1. Ajuste da vazão de H₂ e ar para maior limite de tolerância a atomização de interferentes

Como mencionado anteriormente, foi verificada uma forte supressão do sinal analítico nas medições de As. Assim, o estudo da alteração da vazão de H₂ e ar para produção de uma maior quantidade de radicais hidrogênio durante a etapa de atomização, na tentativa de obter maior limite de tolerância para a atomização de interferentes, foi investigada. Inicialmente, as vazões de H₂ e ar atmosférico (fonte

adicional de O_2), 15 e 32 $ml\ min^{-1}$, respectivamente, que haviam sido utilizadas para a análise de especiação de As em material biológico, foram mantidas. Posteriormente, o monitoramento do sinal analítico (absorbância integrada), juntamente com o desvio padrão relativo (RSD) das medições obtidas, foi estudado em relação ao acréscimo da vazão de H_2 e ar atmosférico. Como reportado na literatura⁷⁴, a melhor razão estequiométrica H_2/O_2 para o emprego do multiatomizador foi na proporção de 3:1. Neste sentido, procurou-se modificar as vazões de hidrogênio e ar atmosférico, mantendo constante a razão estequiométrica de 3:1 e as vazões de H_2 /ar avaliadas foram: 21 e 45, 27 e 57 e 33 e 70 $ml\ min^{-1}$. Os resultados de absorbância em função da vazão de hidrogênio/ar atmosférico obtidos para a determinação de As na solução de referência de $1\ \mu g\ l^{-1}$ e no antimoniato de meglumina estão mostrados na Figura 19.

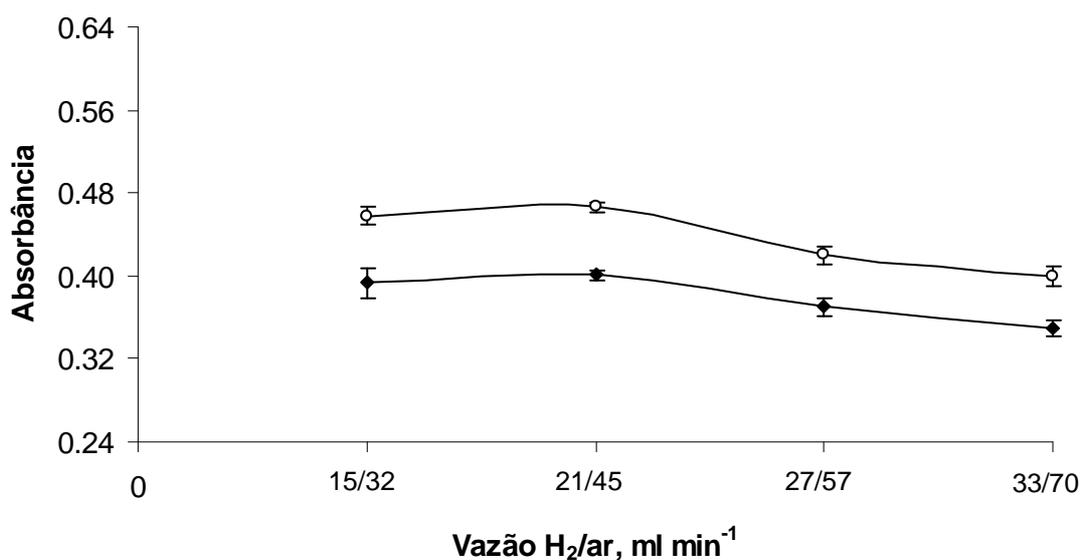


Figura 19. Absorbância integrada para As na amostra de antimoniato de meglumina 2000 vezes diluída com água (○) e solução de referência na concentração de $1\ \mu g\ l^{-1}$ de As (III) na forma inorgânica (◆), durante a otimização da vazão de H_2 /ar.

Os resultados obtidos mostraram que o sinal analítico não foi alterado significativamente para a vazão de 21 e 45 $ml\ min^{-1}$ de H_2 e ar atmosférico, respectivamente. Contudo, o RSD das medições na ordem de 40 a 50% inferior em comparação com o RSD obtido para as determinações empregando as vazões de H_2 /ar 15 e 32 $ml\ min^{-1}$, respectivamente. Vazões mais altas de H_2 e ar atmosférico

foram aplicadas na tentativa de alcançar melhores resultados e, ainda, obter menores RSDs. Entretanto, uma redução no sinal analítico foi observada para vazões de 27 e 57 ml min⁻¹ de H₂ e ar atmosférico, respectivamente. Com o objetivo de confirmar os resultados até aqui obtidos, vazões ainda maiores de H₂ e ar atmosférico (33 e 70 ml min⁻¹, respectivamente) foram empregadas para posterior investigação do sinal analítico. Após, também foi observada uma redução no sinal analítico com o uso destas vazões e, provavelmente, estes resultados estejam correlacionados ao fato de que o oxigênio possui duas funções: participação na formação de radicais hidrogênio e no deslocamento dos átomos no estado fundamental e gasoso para regiões mais frias do atomizador e/ou para fora do atomizador.

4.3.2. Avaliação do emprego de ácido cítrico para a formação de complexo com Sb(V)

A adição de ácido cítrico às amostras de medicamentos, previamente às análises, foi estudada com o objetivo de minimizar a geração de estibina (SbH₃) e, conseqüentemente, evitar interferências na determinação de As. Diferentes concentrações foram empregadas na avaliação da formação do complexo de Sb(V) com o grupamento terminal de ácido carboxílico da molécula do ácido cítrico. Cabe ressaltar, que o emprego do ácido cítrico foi investigado mesmo na presença de L-cisteína adicionada na etapa de pré-redução. Devido ao fato que a concentração de Sb nas amostras é muito alta, a concentração de L-cisteína adicionada, possivelmente, não é suficiente para a redução total desta espécie e, assim, assegurar que o Sb(V) permaneça em solução.

Segundo reportado na literatura^{44,108}, a adição de ácido cítrico 10% (m/v) possibilita reduzir a interferência de Sb na determinação de As. Desta forma, o estudo para avaliar o efeito da concentração de ácido cítrico na redução da interferência de Sb na determinação de As foi feito na concentração de 10% (m/v). Os resultados obtidos, sem e com a adição de ácido cítrico 10% na amostra de antimoniato de meglumina, avaliando a absorvância e o sinal de fundo, podem ser visualizados na Figura 20.

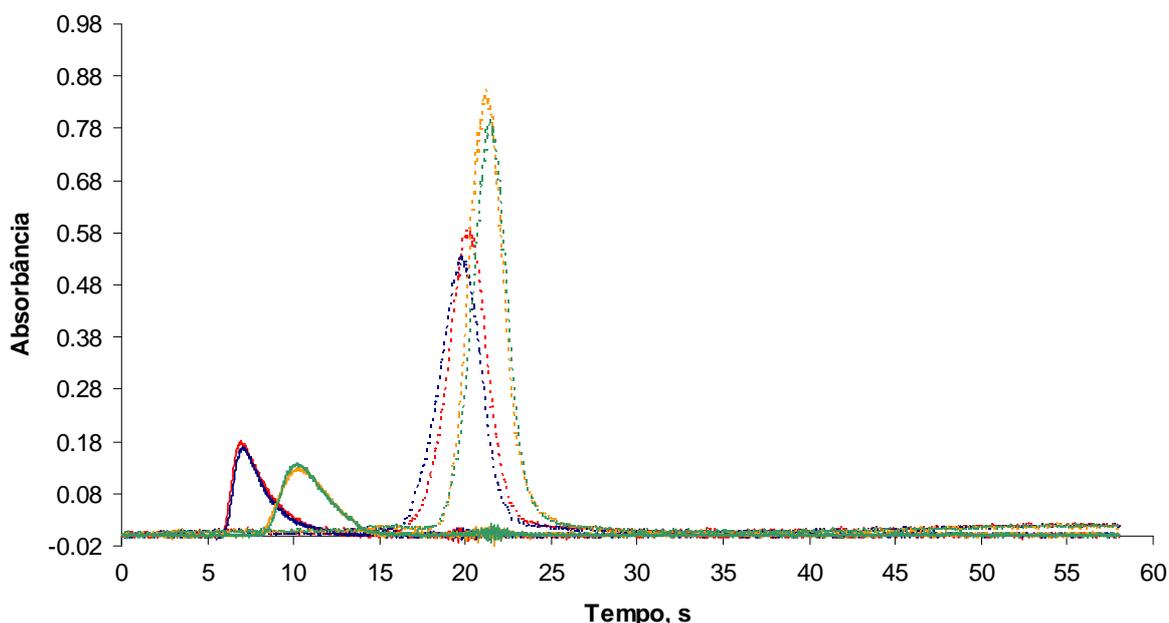


Figura 20. Sinais obtidos para determinação de As na forma inorgânica na amostra de antimoniato de meglumina (linha contínua) e respectivo sinal de fundo (linha pontilhada), para o estudo do emprego de ácido cítrico. Sinal de absorbância com adição de ácido cítrico 10% (m/v), (—) replicata A ($A_{\text{int}} = 0,43$ s) e (—) replicata B ($A_{\text{int}} = 0,43$ s); Sinal de fundo com adição de ácido cítrico 10% (m/v), (---) replicata A ($A_{\text{int}} = 2,16$ s e $Alt_{\text{pico}} = 0,85$) e (---) replicata B ($A_{\text{int}} = 2,01$ s e $Alt_{\text{pico}} = 0,79$); Sinal de absorbância sem adição de ácido cítrico (—) replicata A ($A_{\text{int}} = 0,41$ s) e (—) replicata B ($A_{\text{int}} = 0,39$ s); Sinal de fundo sem adição de ácido cítrico (---) replicata A ($A_{\text{int}} = 1,67$ s e $Alt_{\text{pico}} = 0,58$) e (---) replicata B ($A_{\text{int}} = 1,63$ s e $Alt_{\text{pico}} = 0,54$). Resultados obtidos para a injeção de 0,5 ml de amostra diluída 2000 vezes com água.

Foi avaliada a influência do tempo de repouso na ação do ácido cítrico para a complexação do interferente. Não houve diferença entre os resultados obtidos empregando 30 min e 1 h como tempo de repouso. Estes parâmetros foram escolhidos, de acordo com o tempo empregado na etapa de redução, onde 30 min são necessários para a reação entre as espécies de As e a L-cisteína, e conforme Flores *et al.*⁴⁴ que empregaram 1 h como tempo de repouso para a ação do ácido cítrico. Desta forma, após a adição de ácido cítrico as amostras foram deixadas em repouso por 30 min antes da análise e foi observada uma redução, pouco significativa, do sinal de fundo obtido para a determinação de As com a adição

prévia de ácido cítrico na concentração de 10% (m/v). Este fato indica que, possivelmente, houve redução da formação do hidreto de Sb e, assim, outras concentrações de ácido cítrico (1, 2, 4, 6, 8 e 10%, m/v) também foram investigadas. De acordo com os resultados obtidos, a redução do sinal analítico de As, e aumento sucessivo dos brancos analíticos, foram maiores com o uso de concentrações mais elevadas de ácido cítrico. Como a redução do sinal analítico poderia ser associada à baixa eficiência de geração da arsina, optou-se por investigar alguns parâmetros operacionais, em função da adição de ácido cítrico.

Pequenas alterações no pH podem influenciar drasticamente a eficiência de geração de hidretos devido ao emprego da L-cisteína na etapa de redução. O emprego da L-cisteína é muito importante, pois garante a geração de arsina a partir de compostos de As(III) e As(V), mesmo em pH relativamente alto, já que uma etapa prévia de pré-redução é empregada. Por outro lado, quando a etapa de pré-redução não é empregada, a geração de compostos voláteis somente ocorre a partir de As(III), desde que o pH seja mantido elevado. Contudo, a redução da faixa de trabalho do pH durante as análises constitui a principal limitação para o emprego da L-cisteína. Por isso, o primeiro parâmetro reacional investigado após a adição de ácido cítrico foi o pH. Desta forma, foram feitas as medições de pH após a mistura reacional em amostras pré-tratadas com diferentes concentrações de ácido cítrico. Os resultados de absorvância integrada para o antimoniato de meglumina e para os brancos analíticos em razão do pH e da concentração de ácido cítrico são mostrados na Figura 21.

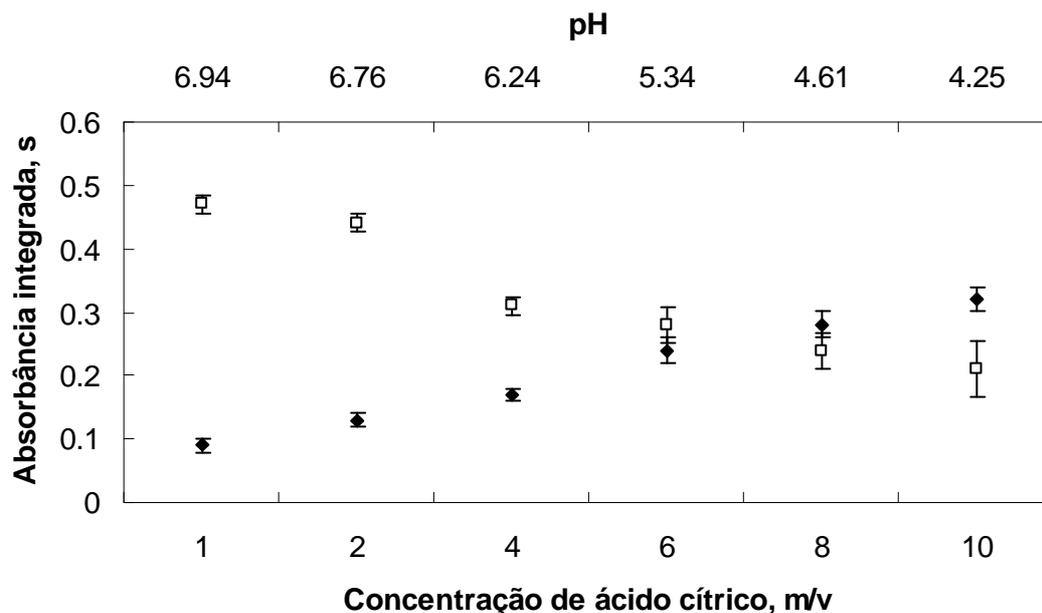


Figura 21. Absorbância integrada dos brancos (◆) e para As na forma inorgânica (□) em amostras do antimoniato de meglumina (diluição de 2000 vezes com água) em relação à adição de ácido cítrico e mudanças no pH. Cada ponto representa a média de três medidas com seu respectivo desvio padrão.

Em função dos resultados obtidos, foi verificado um aumento significativo dos valores de absorbância integrada para os brancos, com o uso de maiores concentrações de ácido cítrico. Além disso, com o aumento da concentração de ácido cítrico, e conseqüente diminuição do pH, a eficiência de geração da arsina foi reduzida. Por isso, outras alternativas foram estudadas para a minimização da ação do interferente sobre a determinação de As.

4.3.3. Avaliação dos ensaios de recuperação em amostras de antimoniato de meglumina

Os ensaios de recuperação para todas as espécies de As estudadas foram feitos com amostras de antimoniato de meglumina. Inicialmente, as amostras foram diluídas 2000 vezes em água. Posteriormente, foi feita a adição quantitativa de um determinado volume de uma solução de As(III) na forma inorgânica (concentração de $100 \mu\text{g l}^{-1}$) para que a concentração final na amostra fosse de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ e as

recuperações obtidas foram de $94,7 \pm 1,5\%$. De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que, embora os valores de recuperação foram muito próximos a 100%, existem pequenas diferenças na recuperação que podem estar associadas aos efeitos de matriz da amostra.

Posteriormente, foram efetuados os ensaios de recuperação para as espécies de MMA(V), DMA(V) e TMAO. Cabe ressaltar que, o ensaio de recuperação para a espécie de As(III) na forma inorgânica foi, novamente, feito em conjunto com as demais espécies, com o intuito de confirmar os resultados obtidos anteriormente. Assim, a amostra foi novamente diluída 2000 vezes com água e, previamente à aferição final, foi adicionada uma solução de concentração conhecida de maneira que a concentração final de todas as espécies de As na amostra fosse de $1 \mu\text{g l}^{-1}$. Entretanto, foi verificado uma intensa supressão do sinal analítico, principalmente, para as espécies de MMA e DMA, conforme mostrado na Figura 22.

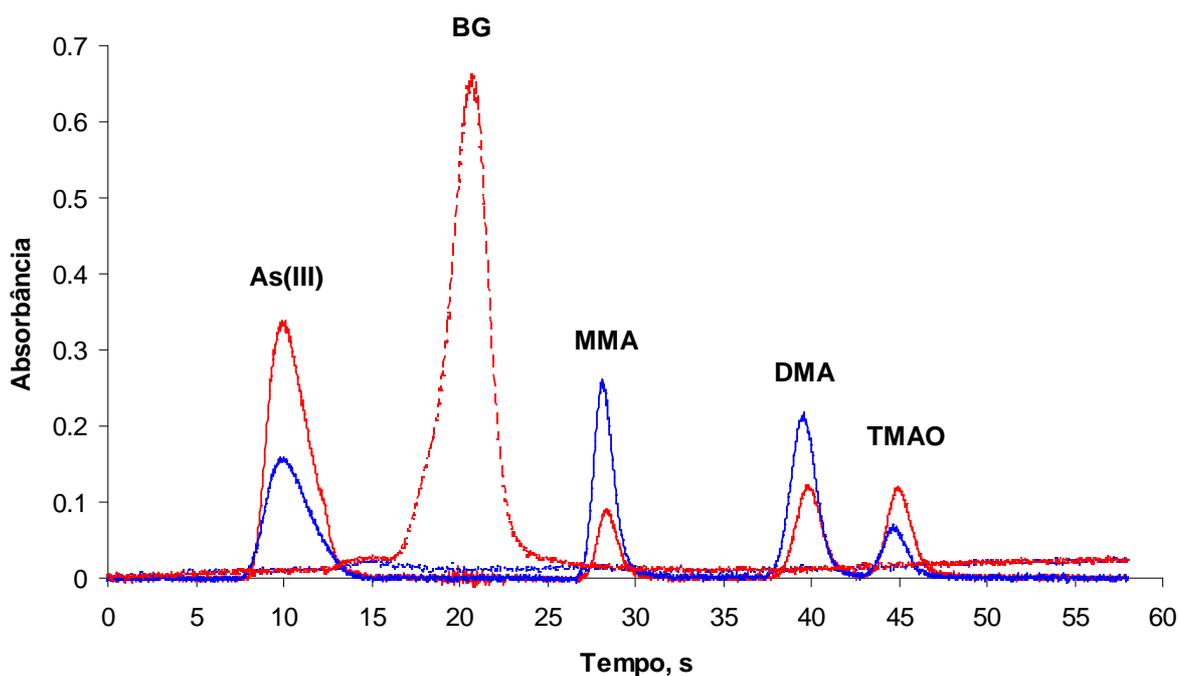


Figura 22. Ensaio de recuperação de As na amostra de antimoniato de meglumina. As linhas contínuas representam os sinais referentes à solução de referência (na cor azul) e do ensaio de recuperação na amostra de antimoniato de meglumina (na cor vermelha) para As(III) na forma inorgânica, MMA(V), DMA(V) e TMAO na concentração de $1 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. Os sinais de fundo para a solução de referência e ensaio de recuperação estão representados pelas linhas pontilhadas.

Os ensaios de recuperação mostraram uma forte supressão do sinal analítico, principalmente, para as espécies de As que são volatilizadas após a geração da estibina. O efeito de ação do interferente, provavelmente, esteja relacionado com a elevada concentração de SbH_3 no atomizador, o que promove o intenso consumo de radicais hidrogênio, modificação da superfície interna do atomizador de quartzo e formação de partículas sólidas no caminho óptico. Estes fatores podem comprometer a eficiência de atomização e intensificar a formação de dímeros ou espécies moleculares de As na célula de atomização.

Adicionalmente, como pode ser visualizado na Figura 22, a etapa de aprisionamento criogênico atua na retenção (pré-concentração) e separação das espécies de interesse. Contudo, como uma etapa prévia de redução foi empregada, grande parte do Sb(V) presente no medicamento foi reduzida e, conseqüentemente, reagiu com o NaBH_4 para a formação de SbH_3 , visto que as características químicas dos hidretos de As e Sb são semelhantes e os pontos de ebulição da arsina, estibina e metilarsina são $-62,5$, -17 e 2 °C, respectivamente. Desta forma, como mostrado na Figura 21, a ordem de eluição foi de AsH_3 , SbH_3 (ilustrada pelo sinal de fundo), MAsH_2 , DMAsH e TMA s, respectivamente. Então, a dificuldade em determinar As em amostras de antimonato de meglumina é devido à presença do interferente, como espécie volátil, e sua respectiva concorrência pelo hidrogênio radicalar, juntamente com o analito no atomizador. No caso da análise de especiação de As em antimonato de meglumina, a formação da estibina foi a principal interferência observada.

Neste sentido, como uma boa resolução foi alcançada entre o interferente e as duas primeiras espécies de As, investigou-se a possibilidade de adicionar uma válvula posicionada antes do atomizador, com três vias, movida manualmente, para a liberação da estibina formada. Desta forma, os tempos de retenção das espécies foram observados e, logo após a eluição da arsina, a válvula foi aberta durante 11 s para que o gás carreador fosse desviado no sentido do exaustor. Após a eliminação da estibina, a válvula foi fechada e o sentido do gás carreador foi restabelecido na direção do atomizador para que as espécies de MAsH_2 , DMAsH e TMA s fossem determinadas. Uma melhor avaliação do emprego desta válvula foi feita através dos ensaios de recuperação para todas as espécies estudadas, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperações alcançadas para as espécies de As estudadas com e sem emprego da válvula utilizada para a liberação da estibina antes do atomizador.

Espécie	Sem válvula	Com válvula
AsH ₃	95,2 ± 2,0	94,9 ± 3,3
MAsH ₂	25,8 ± 1,5	103,3 ± 8,3
DMAsh	48,9 ± 1,6	95,3 ± 4,7
TMAsh*	97,1 ± 2,2	100,8 ± 3,1

* Sem emprego da etapa de pré-redução

Cabe ressaltar que durante os ensaios de recuperação foi empregada, previamente a análise, a etapa de pré-redução com L-cisteína. Desta forma, a espécie de TMAO foi reduzida para a formação da espécie volátil de trimetilarsênio e perdas significativas por volatilização foram observadas ao longo do tempo, mesmo antes da análise. Por isso, as sucessivas medidas de uma mesma solução de referência de TMAO, apresentaram uma queda significativa do sinal analítico. Contudo, para os ensaios de recuperação do TMAO nas amostras de antimoniato de meglumina, foi observado um comportamento diferente, visto que a estabilização do sinal analítico do TMAO foi alcançada. Provavelmente, este fato está associado à ação da meglumina sob a espécie de TMAsh e assim, as perdas por volatilização são minimizadas. Entretanto, as recuperações para a espécie de trimetilarsina sem o emprego da etapa pré-redução foram superiores a 95%, independente do uso da válvula. Devido a matriz do medicamento ser composta, na sua maioria, por Sb possivelmente, ocorre a formação de SbH₃ em concentrações elevadas o suficiente para competir por radicais hidrogênio, no interior do atomizador, com os compostos de As. Esta competição, provavelmente, causa um desequilíbrio momentâneo no atomizador e a concentração das espécies radicalares não é suficiente para a atomização dos hidretos de As e Sb. Contudo, como pode ser observado, as recuperações para a espécies de TMAsh não foram influenciadas pela presença do interferente e, provavelmente, o equilíbrio tenha sido restabelecido.

Ademais, como mencionado na revisão da literatura a presença de outros elementos (Sb) no atomizador pode provocar reações paralelas com o analito e promover a formação de espécies moleculares a partir de elementos no estado atômico, em sentido contrário ao princípio da AAS.

Os resultados das recuperações com o uso da válvula apresentaram desvios padrão superiores aos resultados obtidos sem o emprego da válvula. Devido ao fato de que a etapa de aprisionamento criogênico não foi feita no modo automatizado, ou seja, a inserção ou remoção do tubo em “U” no nitrogênio líquido foi feita manualmente e com isso, pequenas mudanças no tempo de retenção das espécies foram observadas. Ademais, o controle da válvula também foi feito manualmente e como os tempos de retenção foram, ligeiramente, modificados a abertura ou fechamento da válvula pode ser responsável pela integração não adequada do iAs e MMA.

4.3.4. Quantificação de As na forma inorgânica em antimoniato de meglumina por HG-CT-AAS empregando o procedimento de calibração por adição padrão

De acordo com os resultados obtidos para os ensaios de recuperação, foi possível verificar que ocorreu uma pequena supressão do sinal analítico para o arsênio na forma inorgânica. Devido a este fato, o procedimento de calibração com adição padrão foi escolhido para a determinação de As nas amostras de antimoniato de meglumina. A calibração somente foi efetuada para a determinação de As na forma inorgânica, visto que os resultados até aqui discutidos não apresentam nenhuma evidência da presença de espécies metiladas no medicamento (Figura 18). Com relação à determinação de As na forma inorgânica em antimoniato de meglumina, é importante destacar que o procedimento utilizado permitiu quantificar as espécies de As na forma inorgânica de acordo com seus respectivos estados de oxidação. Cabe ressaltar que esta informação é de fundamental importância para os estudos de toxicidade de As, visto que a toxicidade varia de acordo com o estado de oxidação da espécie. Neste caso, a informação da concentração da espécie inorgânica, de acordo com o seu estado de oxidação, é extremamente importante uma vez que este medicamento é injetado diretamente na corrente sanguínea e os efeitos tóxicos podem, assim, possuir uma maior intensidade quando comparados à outras formas de administração.

Conforme descrito na literatura, este sistema apresenta a mesma sensibilidade para as espécies de As(III) e As(V) e permite que a calibração seja

efetuada com uma única espécie. A curva de calibração construída a partir da técnica de adição padrão, a equação de reta e o coeficiente de linearidade obtido são mostrados na Figura 23.

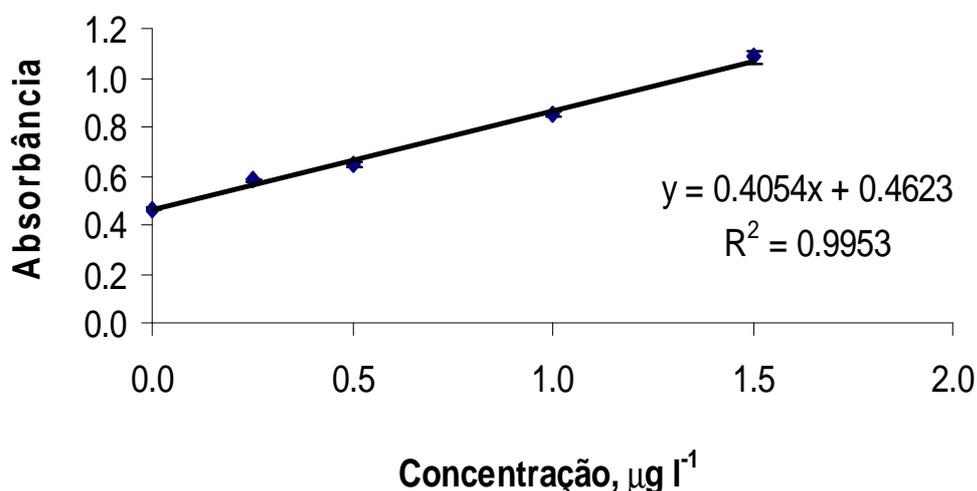


Figura 23. Curva de calibração obtida empregando a técnica de adição padrão para a determinação de As inorgânico em antimoniato de meglumina.

Após a calibração do sistema, foi feita a determinação de As em cinco lotes do medicamento. As amostras foram adquiridas diretamente do fabricante e os lotes foram identificados como A, B, C, D e E. Inicialmente, a etapa de pré-redução foi empregada para a quantificação de As(III) na forma inorgânica presente naturalmente na amostra e, a partir da redução de compostos de As(V). Posteriormente, o sistema foi descontaminado com HCl 1 mol l⁻¹ seguido da lavagem dos capilares com água para eliminar a presença de pequenas quantidades de L-cisteína.

Em seguida, foi feita a quantificação de As(III) na forma inorgânica sem o emprego da etapa prévia de pré-redução considerando que, em pH 6 a espécie de As(V) não é reduzida pelo NaBH₄ e, conseqüentemente, não gera espécie volátil. Cabe ressaltar que, inicialmente, as amostras foram diluídas 2000 vezes para a determinação de As(III) na forma inorgânica. Contudo, foi verificado que esta diluição foi excessiva, visto que a concentração de As(III) na forma inorgânica era muito inferior a concentração de As(V). Desta forma, as amostras foram diluídas 400 vezes.

Além disso, foi observado um aumento sucessivo do sinal analítico ao longo do tempo para a determinação de As(III) na forma inorgânica. Possivelmente, este fato pode estar relacionado ao equilíbrio natural para a presença de compostos de As no estado de oxidação (III) e (V), embora não tenha sido encontrados relatos na literatura para explicar este comportamento. Assim, o tempo necessário para o restabelecimento do equilíbrio entre as espécies foi avaliado. Segundo os resultados obtidos, o sinal analítico aumentou de forma crescente, atingindo um patamar para um tempo de até duas horas após a diluição inicial das amostras. Devido ao tempo para o restabelecimento do equilíbrio entre as duas espécies no antimoniato de meglumina ser superior a duas horas, as diluições das amostras foram efetuadas com um tempo mínimo de 12 h de repouso, anteriormente à etapa de detecção. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos, em absorbância integrada, para as determinações de As nas amostras de antimoniato de meglumina ao longo do tempo de repouso contabilizado a partir do momento em que a diluição foi efetuada.

Tabela 9. Resultados para a determinação de As(III) na forma inorgânica em diferentes lotes do antimoniato de meglumina (diluição de 400 vezes em água), relacionados ao tempo de repouso após a diluição.

Absorbância integrada, s				
Tempo, min	Lote A (rep. 1)	Lote A (rep. 2)	Lote B (rep. 1)	Lote C (rep. 1)
0	0,072	0,065	0,075	0,044
11	0,111	0,101	0,100	0,059
22	0,123	0,111	0,123	*ND
33	0,129	0,128	0,130	0,066
44	0,128	0,136	0,131	*ND
55	0,138	ND	0,150	0,067
120	ND	ND	0,167	0,072

* ND = não determinado

Os resultados apresentados na Tabela 10 foram plotados na forma de gráfico (Figura 24), e correlaciona a absorbância obtida em função do tempo de repouso.

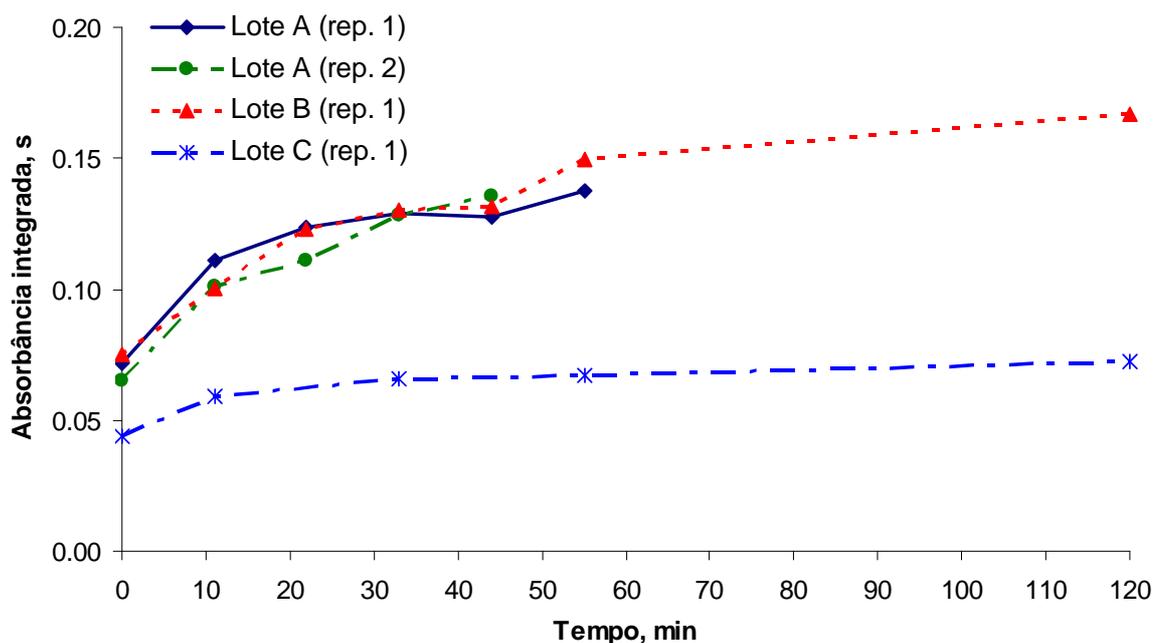


Figura 24. Concentração de As em diferentes lotes de antimoniato de meglumina, em relação ao tempo de repouso (diluição de 400 vezes).

Foi possível observar que o sinal analítico para As aumentou com o acréscimo dos intervalos de tempo de repouso investigados. Os resultados obtidos mostraram que, provavelmente, ocorreu um deslocamento do equilíbrio químico natural do As na forma inorgânica nos estados de oxidação (III) e (V), devido ao fato de que o pH e/ou potencial redox das amostras tenha sido alterado. Porém, acredita-se que esta alteração seja momentânea pela adição de água no ato da diluição das amostras e, por isso, o equilíbrio voltou a ser restabelecido com um maior tempo de repouso.

Após o tempo de equilíbrio ser restabelecido, foram efetuadas as determinações de As(III) na forma inorgânica. Cabe ressaltar que, os teores de As(V) na forma inorgânica foram calculados com base nos resultados obtidos com o emprego da etapa de pré-redução e, posteriormente, subtraídos dos resultados sem o uso do pré-redutor. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados obtidos para a determinação de As na forma inorgânica, nos estados de oxidação III e V, em cinco lotes de antimoniato de meglumina por HG-CT-AAS (n = 3).

Lote	Concentração, mg l ⁻¹		
	iAs (III)	iAs (V)*	iAs total
A	0,174 ± 0,001	2,12 ± 0,03	2,29 ± 0,03
B	0,192 ± 0,005	1,82 ± 0,02	2,01 ± 0,02
C	0,129 ± 0,004	1,09 ± 0,02	1,22 ± 0,02
D	0,121 ± 0,002	1,06 ± 0,02	1,18 ± 0,02
E	0,087 ± 0,001	0,82 ± 0,01	0,91 ± 0,01

* iAs(V) = iAs total – iAs(III)

Os limites de detecção e quantificação do procedimento de HG-CT-AAS para a determinação de arsênio foram de 0,11 e 0,14 µg l⁻¹, respectivamente.

4.3.5. Determinação de arsênio total por ICP-MS

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos para a determinação de As empregando o procedimento de HG-CT-AAS, foi efetuada a determinação de As total por ICP-MS. As condições operacionais do equipamento foram descritas no item 3.1 (*Materiais e Métodos*). Cabe ressaltar que, para a análise de As total por ICP-MS a técnica de calibração externa foi escolhida, visto que os ensaios de recuperação, efetuados previamente à determinação de As, apresentaram resultados muito próximos a 100%. Provavelmente, os efeitos de sorção no capilar do amostrador do ICP-MS e no sistema de nebulização são menos intensos quando comparados ao procedimento de HG-CT-AAS, visto que o caminho que a amostra percorre no interior do tubo do amostrador é menor e, além disso, menos de 5% da amostra líquida é nebulizada e injetada no plasma. Desta forma, as amostras foram diluídas com água (2000 vezes) e, posteriormente, analisadas empregando a técnica de ICP-MS. Na Tabela 11 são mostrados os resultados obtidos para a determinação de As total por ICP-MS nos cinco lotes de antimoniato de meglumina.

Tabela 11. Determinação de As total por ICP-MS em cinco lotes de antimoniato de meglumina (n = 3).

Lote	Concentração de iAs total, mg l ⁻¹
A	2,19 ± 0,08
B	2,05 ± 0,04
C	1,19 ± 0,03
D	1,16 ± 0,04
E	0,93 ± 0,03

Após a determinação de As por ICP-MS e HG-CT-AAS, os resultados obtidos foram comparados e o tratamento dos dados foi feito aos pares, visto que as médias alcançadas foram obtidas com o emprego de dois procedimentos de determinação, é recomendada a aplicação do teste-*t* para dados pareados. Esta metodologia foi escolhida, visto que um maior grupo de dados pode ser utilizado, ou seja, a comparação da diferença de médias para dois conjuntos. Caso contrário, as médias obtidas seriam avaliadas para cada um dos lotes individualmente. Desta forma, as médias obtidas (concentração total de As), para cada um dos lotes, foram agrupadas de acordo com o procedimento escolhido para a determinação de As. Os dados foram analisados empregando o suplemento de ferramentas de análise do *software* Excel. O resultado para a análise dos dados mostrou que o valor do *t*-estatístico (0,75), para o nível de confiança de 95%, não foi superior ao valor do *t*-crítico bicaudal (2,78). Desta forma, pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre as médias obtidas empregando os dois procedimentos de determinação de As. O limite de detecção obtido para a determinação de As total por ICP-MS foi de 0,25 µg l⁻¹.

4.3.6. Análise de especiação de As por LC-ICP-MS

A cromatografia a líquido acoplada à ICP-MS foi utilizada para avaliação da presença de espécies metiladas de As. Como anteriormente mencionado, apenas a presença de As na forma inorgânica foi verificada durante as análises com o emprego da HG-CT-AAS. Contudo, com o objetivo de confirmar os resultados até aqui discutidos, a LC-ICP-MS foi utilizada, já que este acoplamento é altamente

difundido para a análise de especiação de As em diversos tipos de amostras e não requer que a amostra seja derivatizada, como exigido na separação empregando a cromatografia a gás.

A escolha da fase móvel depende do tipo de coluna empregada, do tipo de espécies a serem separadas e do detector utilizado durante a análise de especiação. No caso da análise de especiação de As, colunas de troca aniônica e fase móvel de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ têm sido comumente empregadas na separação de As(III) e As(V) na forma inorgânica, MMA e DMA, que são as espécies de interesse neste trabalho.^{113,119} Contudo, o estudo da concentração da fase móvel, pH e modo de eluição isocrático ou gradiente foram avaliados para obter uma melhor resolução entre as espécies de As estudadas.

Inicialmente, foi feito o estudo da concentração da fase móvel adequada para a separação das espécies de As, sendo que a faixa de trabalho avaliada foi de 0,02 a 0,1 mol l⁻¹, utilizando uma fase móvel composta de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$. Uma resolução satisfatória das espécies estudadas foi obtida com a concentração de 0,03 mol l⁻¹. Além disso, uma separação mais eficiente foi alcançada com o modo de eluição por gradiente na vazão de 1,5 ml min⁻¹.

É sabido que a cromatografia de íons, assim como os outros tipos de cromatografia, é dependente das características físico-químicas, como propriedades ácido-base e polaridade. Neste sentido, a variação do pH da fase móvel foi avaliada na separação das espécies de As. Verificou-se que em valores de pH mais baixos a maioria das espécies de As está, predominantemente, na forma catiônica, resultando em uma menor interação com a fase estacionária e, assim, o tempo de retenção foi ligeiramente reduzido.

Por outro lado, valores mais elevados de pH reduziram a capacidade de troca da coluna, visto que os grupamentos trocadores são preenchidos por OH⁻ presentes na solução. Uma separação adequada das espécies de As foi obtida utilizando pH 6. Contudo, neste valor de pH ocorre protonação do As(III), formando ácido arsenoso (pK_a 9,28) e do TMA₃AsO, formando TMA₃AsO⁺OH (pK_a 3,6) e, assim, o tempo de retenção destas espécies foi reduzido. Desta forma, ambas as espécies foram eluídas, simultaneamente, e não puderam ser separadas.

Após a otimização, o programa de tempo de eluição na etapa de separação foi de: 1 min empregando 3 mmol l⁻¹ (com tempo de rampa de 0,5 min) e 13 min empregando 30 mmol l⁻¹ (com tempo de rampa de 0,5 min) utilizando $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$

como fase móvel. O cromatograma obtido para a separação das espécies de As(III), MMA, DMA e As(V), na concentração de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ (injeção de $200 \mu\text{l}$) é mostrado na Figura 25.

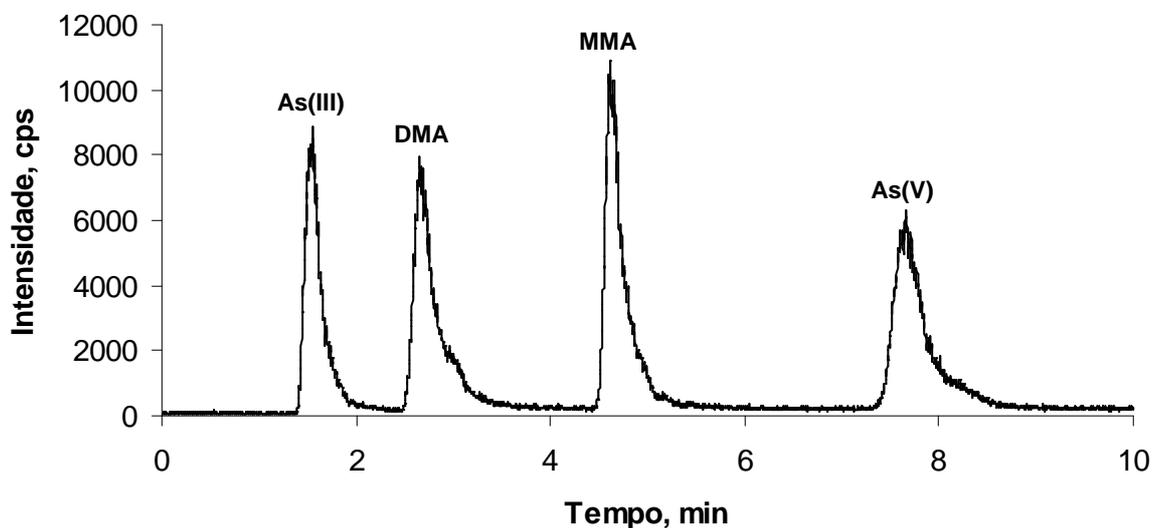


Figura 25. Cromatograma obtido após a injeção de $200 \mu\text{l}$ da solução mista de referência de As na concentração de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, DMA e MMA.

4.3.7. Identificação das espécies de arsênio

Após a otimização dos parâmetros para análise de especiação de As por LC-ICP-MS, o tempo de retenção para as espécies de As(III) e As(V) na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO foi avaliado. Durante a avaliação do tempo de retenção de cada espécie foi verificado que o As(III) na forma inorgânica e TMAO foram eluídos simultaneamente, visto que ambas espécies não possuem interação com o grupo funcional da coluna, como anteriormente mencionado e, desta forma, são eluídas no tempo morto da coluna (Figuras 26 e 27).

Adicionalmente, este fato foi confirmado através da comparação das áreas em um cromatograma obtido a partir de uma solução de referência mista com apenas quatro espécies de As (As(III), MMA, DMA e As(V)) com o cromatograma obtido para a presença de cinco espécies de As (As(III), MMA, DMA, TMAO e As(V)). Para o cromatograma contendo as cinco espécies de As, foi possível

observar um aumento da área correspondente ao primeiro sinal do cromatograma, visto que as espécies de As(III) na forma inorgânica e TMAO foram eluídas simultaneamente, como pode ser observado na Figura 28.

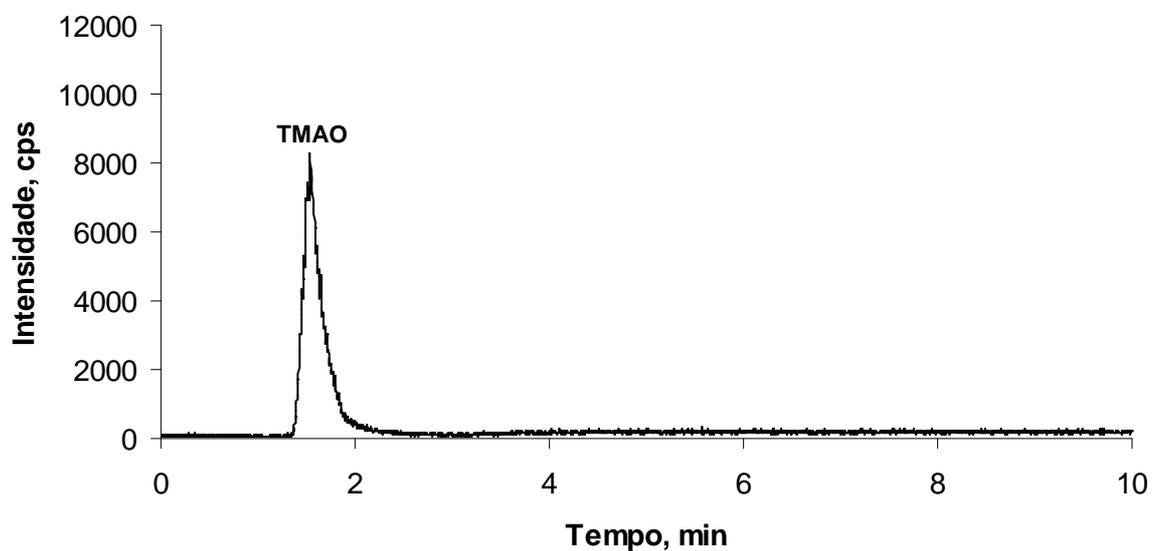


Figura 26. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μ l da solução de referência de As na concentração de 5 μ g l⁻¹ como TMAO.

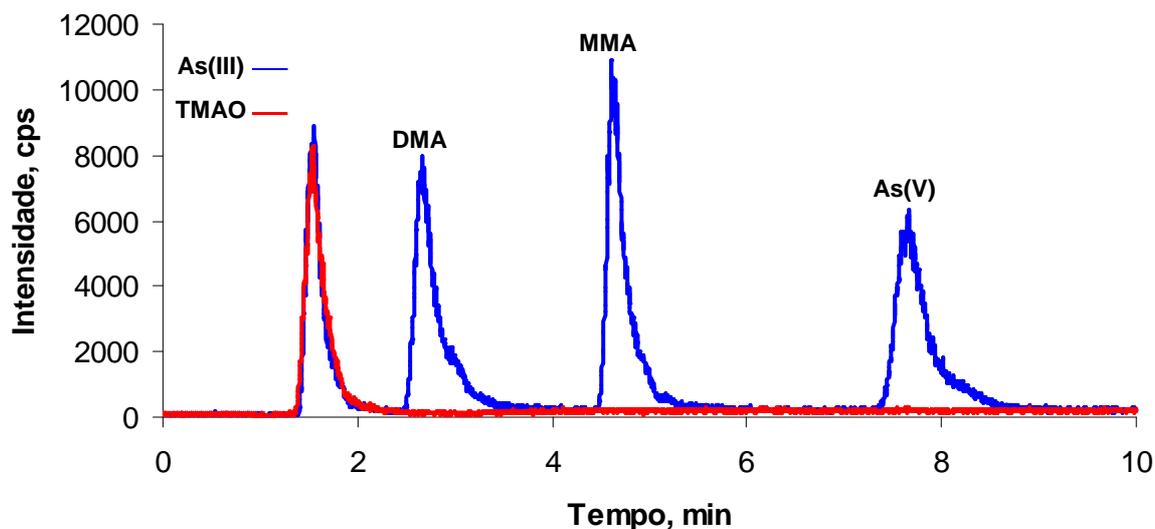


Figura 27. Sobreposição de dois cromatogramas obtidos, separadamente, empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da solução mista de referência de As na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, DMA e MMA (linha azul) e TMAO (linha vermelha).

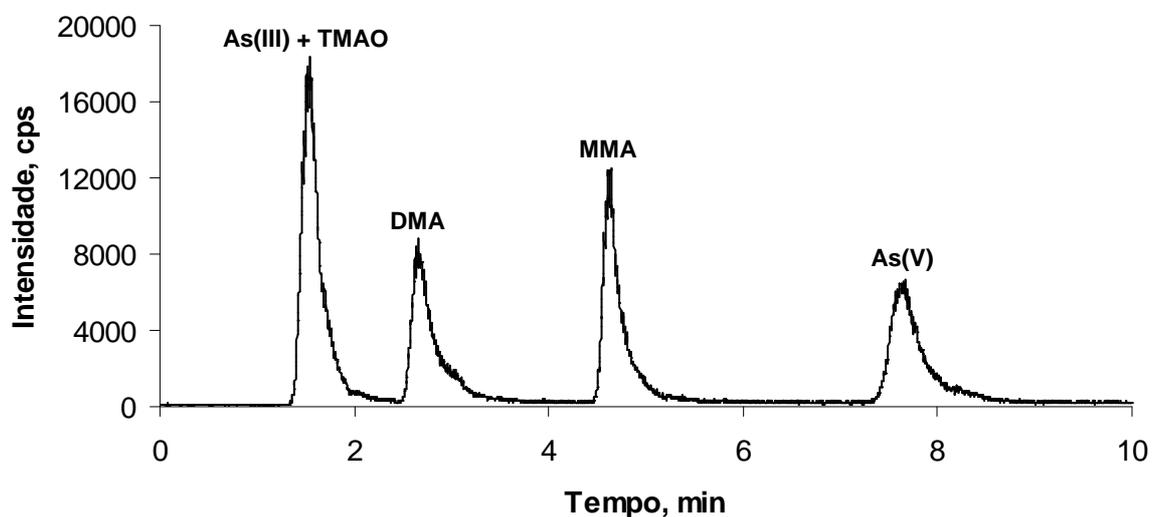


Figura 28. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da solução mista de referência de As na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ como As(III) e As(V) na forma inorgânica, TMAO, DMA e MMA.

4.3.8. Perfil cromatográfico das diferentes amostras de antimoniato de meglumina

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que os diferentes lotes do antimoniato de meglumina utilizados neste estudo apresentaram perfis cromatográficos distintos. Este fato pode estar relacionado às modificações efetuadas durante o processo de produção do medicamento e/ou diferentes tipos de matérias-primas utilizadas. Cabe ressaltar que, dos cinco lotes analisados, apenas dois lotes (A e B) representam o produto na sua forma final disponível comercialmente. Contudo, informações adicionais sobre os demais lotes, os testes de produção e o emprego de diferentes tipos de matéria prima não foram divulgados pelo fabricante. Os cromatogramas obtidos para cada um dos lotes estudados podem ser observados nas Figuras 29 a 33.

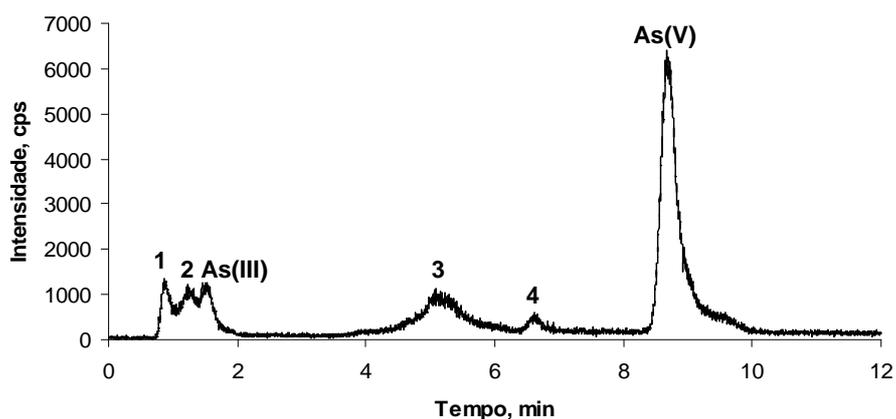


Figura 29. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μ l da amostra de antimoniato de meglumina - **Lote A**, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados.

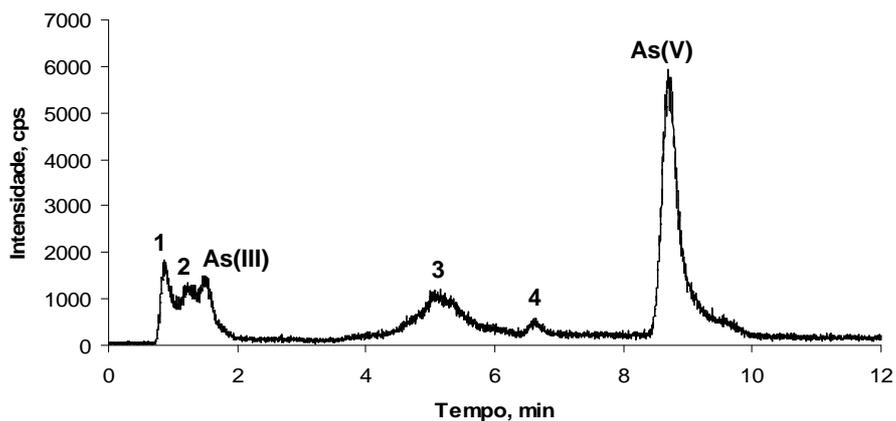


Figura 30. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da amostra de antimoniato de meglumina - **Lote B**, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados.

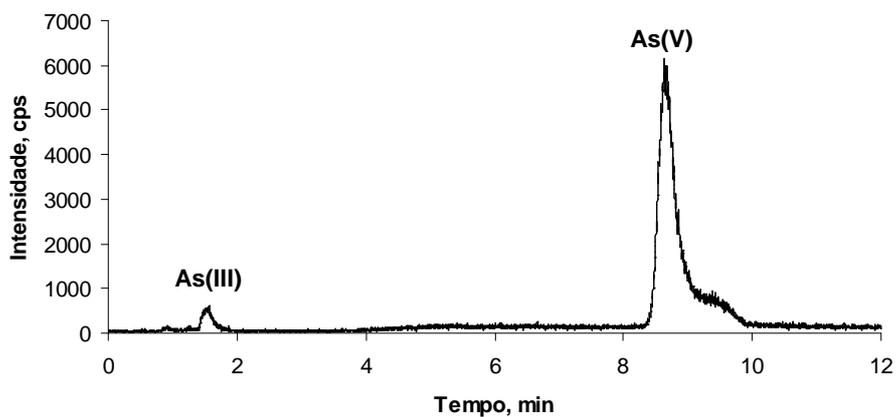


Figura 31. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl da amostra de antimoniato de meglumina - **Lote C**, previamente diluída (200 vezes) em água.

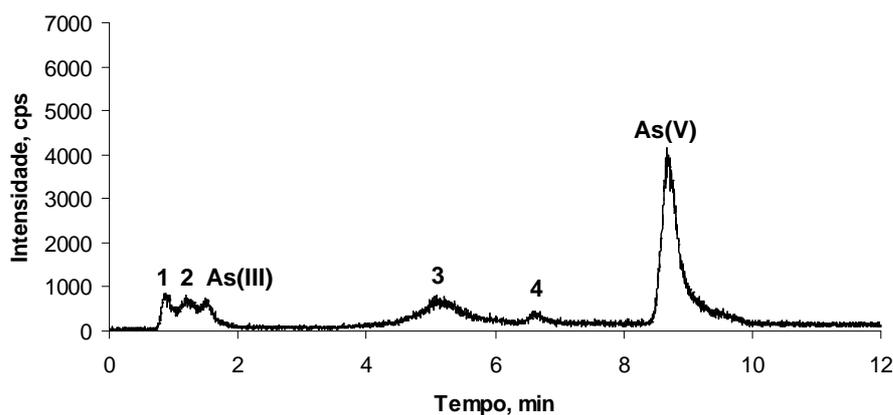


Figura 32. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μ l da amostra de antimoniato de meglumina - **Lote D**, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados.

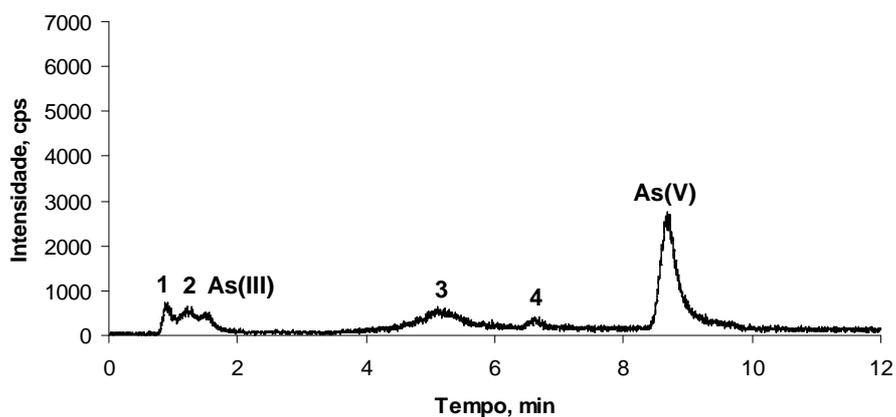


Figura 33. Cromatograma obtido empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μ l da amostra de antimoniato de meglumina - **Lote E**, previamente diluída (200 vezes) em água. Os picos 1, 2, 3 e 4 não puderam ser identificados.

É importante destacar que, além dos sinais analíticos obtidos para as espécies de As(III) e As(V) na forma inorgânica, foram observados outros sinais nas amostras de antimoniato de meglumina. Com o objetivo de identificar outras espécies de As, a adição de uma solução de referência com concentração conhecida de As(III) e As(V) na forma inorgânica, MMA, DMA, às amostras de

antimoniato de meglumina (lotes A, B e C), foi efetuada para posterior comparação dos sinais obtidos (Figura 34 a 36).

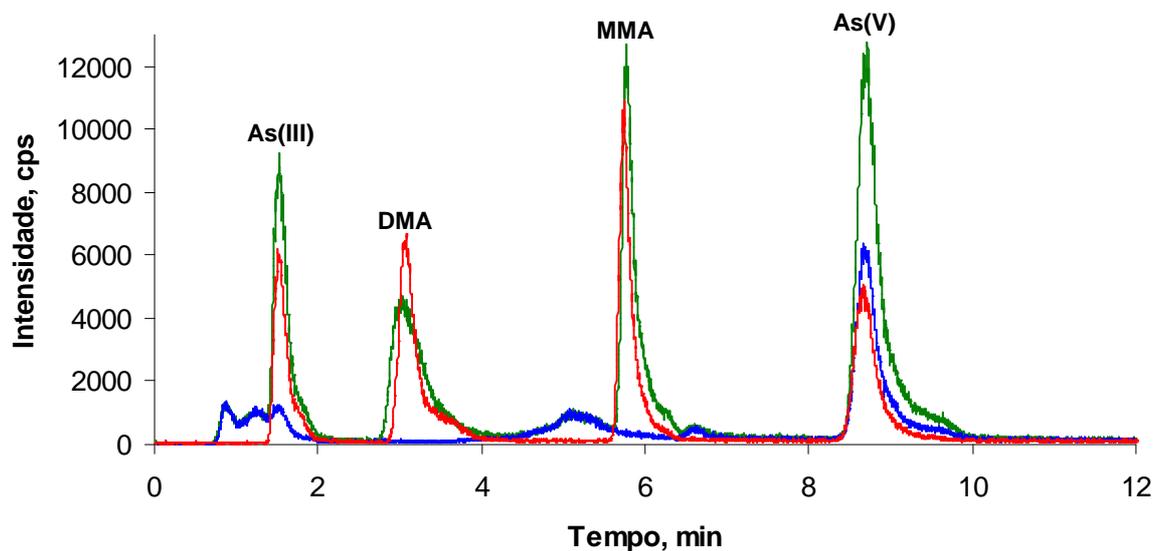


Figura 34. Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl para a solução de referência de As na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (**Lote A**) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).

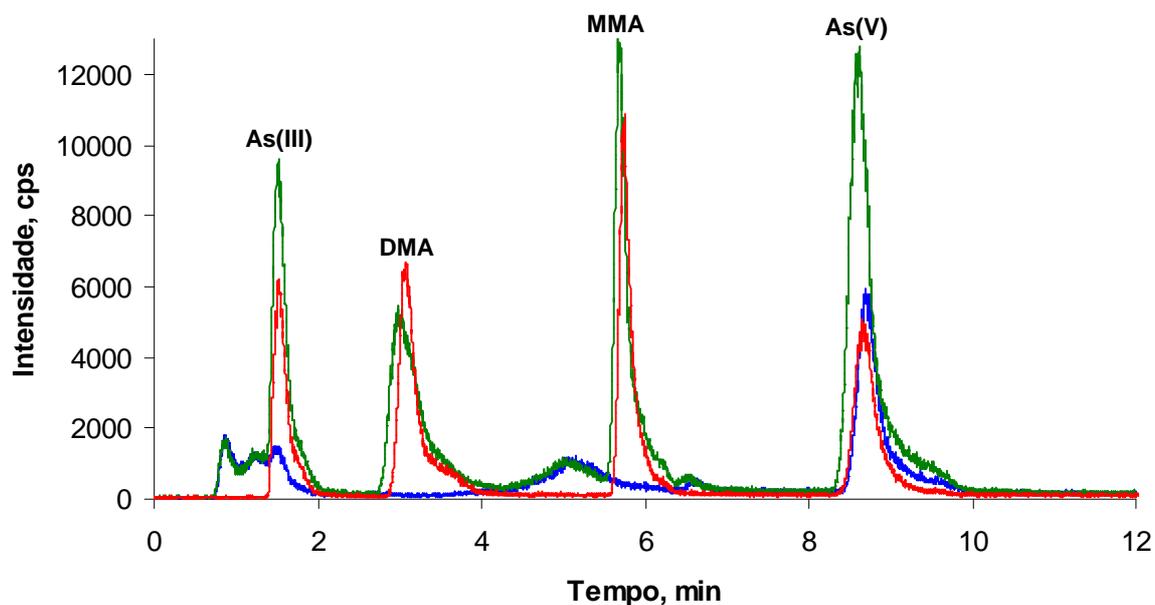


Figura 35. Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl para a solução de referência de As na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (**Lote B**) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).

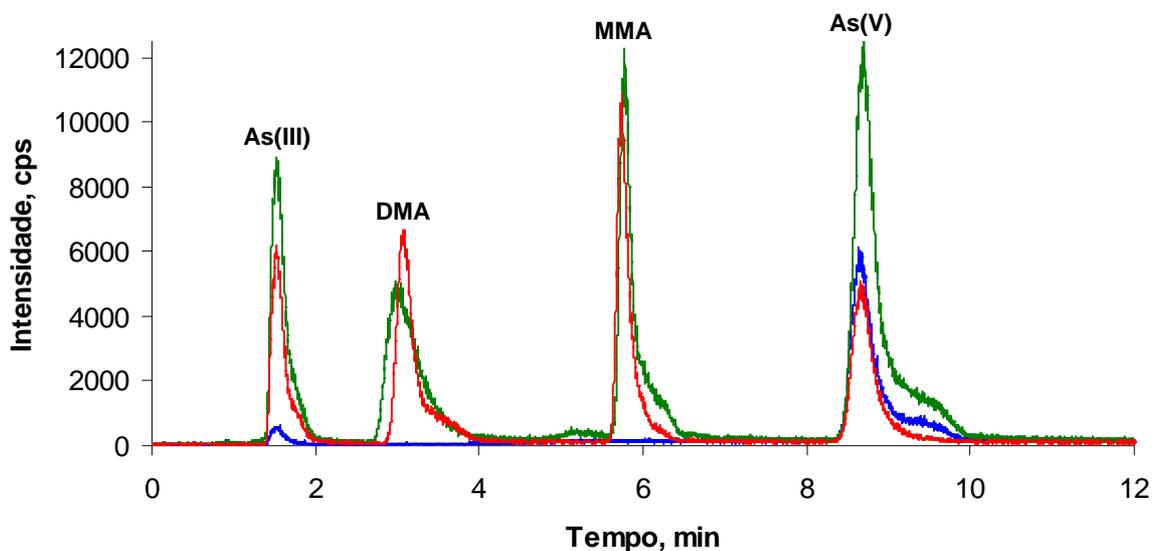


Figura 36. Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS após a injeção de 200 μl para a solução de referência de As na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) inorgânico em água (—), amostra (**Lote C**) diluída 200 vezes com água (—) e adição da solução de referência na concentração de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ na forma de As(III) inorgânico, DMA, MMA e As(V) na amostra (—).

Foi observado, para as amostras diluídas 200 vezes, que os sinais para as soluções de referência, previamente adicionadas, correspondem apenas aos sinais para as espécies de As(III) e As(V) na forma inorgânica. Os demais sinais não apresentaram os mesmos tempos de retenção quando comparados com a solução de referência de MMA e DMA, previamente, adicionada à amostra. Após, a obtenção dos cromatogramas, foram calculados os valores para as recuperações das espécies de As adicionadas às amostras de antimoniato de meglumina. Na Tabela 12 são apresentados os valores das recuperações obtidas para as espécies de As(III) na forma inorgânica, DMA, MMA e As(V) na forma inorgânica.

Tabela 12. Recuperações obtidas para a adição da solução de referência nas amostras de antimoniato de meglumina (n = 3).

Lote	Recuperação, %			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
A	102,1 ± 5,1	90,8 ± 7,9	101,4 ± 4,3	91,6 ± 8,7
B	104,2 ± 4,9	100,3 ± 3,4	109,4 ± 5,4	100,3 ± 4,4
C	114,2 ± 8,3	94,3 ± 5,2	99,7 ± 3,7	94,8 ± 3,6

As recuperações obtidas para todas as espécies de As avaliadas foram superiores a 90%. Estes valores podem ser considerados quantitativos, visto que os desvios padrão, geralmente, para os procedimentos envolvendo técnicas cromatográficas são tolerados até o limite de 10%. Adicionalmente, foi utilizado um recurso matemático para correção do sinal de As(III) na forma inorgânica, pois não foi possível obter uma separação adequada dos outros sinais não identificados e, assim, uma maior variação dos resultados pode ser atribuída a este fato. Foi verificado que, embora alguns sinais não possam ser identificados, os mesmos não mostraram ser interferentes na determinação das espécies de As(III) na forma inorgânica, DMA, MMA e As(V) na forma inorgânica.

Algumas suposições podem ser elaboradas na tentativa de elucidar a presença dos sinais não identificados nos cromatogramas obtidos para as amostras de antimoniato de meglumina. Neste sentido, a hipótese da formação de interferentes a partir da presença de diferentes formas de cloreto ligadas a compostos orgânicos na amostra, também foi avaliada, visto que interferência poliatômica pela formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ (m/z 75) pode ser observada sob a determinação de As. Por outro lado, estudos reportaram que este tipo de interferência somente é significativa para concentrações de Cl superiores a 10 mg l⁻¹.³⁷ Portanto, pode-se supor que os sinais não identificados nas amostras não sejam em razão da formação da espécie poliatômica. A formação da espécie poliatômica $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$ (m/z 75) também foi investigada, visto que a forma de preparo dos medicamentos antimoniais, atualmente, é à base da mistura do sal de KSb(OH)_6 com a meglumina. No entanto, a abundância natural do ^{36}Ar é muito pequena, o que dificulta o processo de formação desta espécie poliatômica.³²

Outra possível explicação para a formação dos sinais não identificados estaria relacionada à formação de complexos de As com a meglumina nas amostras, de forma que, alterações nos tempos de retenção das espécies poderiam ser

observadas. Com o objetivo de investigar este fato, foi feita a determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica nas amostras de antimoniato de meglumina para a posterior comparação com os resultados previamente obtidos por HG-CT-AAS (Tabela 13). Desta forma, foi efetuada a calibração do equipamento com o uso de uma solução de referência de As na forma de DMA dado que, todas as espécies possuem a mesma sensibilidade e a escolha desta espécie foi aleatória.

Tabela 13. Determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica em amostras de antimoniato de meglumina.

Lote	Concentração, mg l ⁻¹	
	As(III)	As(V)
A	0,180 ± 0,004	1,17 ± 0,03
B	0,221 ± 0,032	1,05 ± 0,16
C	0,102 ± 0,001	1,11 ± 0,04
D	0,126 ± 0,006	0,73 ± 0,04
E	0,089 ± 0,004	0,53 ± 0,06

Equação da reta ($y = 379,33X - 68,19$) / $R^2 = 0,9979$

Os resultados obtidos para a determinação de As(III) na forma inorgânica foram concordantes com os resultados obtidos para a análise por HG-CT-AAS. De acordo com a análise estatística empregando o teste-*t* (com intervalo de confiança de 95%), para análise de dois conjuntos de dados pareados, não ocorreu diferença significativa entre as médias obtidas, visto que o valor do *t*-estatístico (0,33) não foi superior ao *t*-crítico bi-caudal (2,78). Contudo, os resultados apresentados para a determinação de As(V) na forma inorgânica não foram concordantes com os resultados obtidos anteriormente por HG-CT-AAS. Desta forma, com o objetivo de verificar se os sinais não identificados poderiam ser As(V) na forma inorgânica complexado com a meglumina ou outras espécies orgânicas foi feita à integração dos sinais não identificados. Assim, foi feito o somatório da concentração dos picos 1, 2, 3 e 4, anteriormente mostrados, conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14. Somatório da concentração dos sinais não identificados. Resultados em mg l⁻¹.

Lote	Sinais não identificados			As(V)	Somatório
	1 e 2	3	4		
A	0,30 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,10 ± 0,02	1,17 ± 0,03	2,02 ± 0,06
B	0,21 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,10 ± 0,03	1,05 ± 0,10	1,79 ± 0,11
C	-	-	-	1,11 ± 0,04	1,11 ± 0,04
D	0,15 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,73 ± 0,04	1,15 ± 0,06
E	0,16 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,53 ± 0,06	0,95 ± 0,07

*equação de reta ($y = 379,33X - 68,19$) / $R^2 = 0,9979$

Foi verificado que a integração dos picos não identificados, e o posterior somatório das concentrações obtidas, foram equivalentes à concentração de As(V) determinada por HG-CT-AAS. Desta forma, foi suposto que estes picos sejam espécies inorgânicas de As(V) complexadas pela meglumina ou outros compostos orgânicos utilizados no meio reacional durante a produção do antimoniato de meglumina. Cabe ressaltar que os sinais 1 e 2 possuem carga positiva ou neutra e, assim, não interagem com a fase estacionária da coluna de troca aniônica e são eluídos no tempo morto. Por isso, a separação dos sinais é muito difícil e poderia ser alcançada somente com o uso de uma coluna catiônica ou de exclusão molecular. Ainda, os sinais 3 e 4, conforme os cromatogramas mostrados, possuem característica aniônica, visto que são eluídos em uma faixa de tempo de 4 a 7 min. Uma melhor resolução para estes sinais também poderia ser obtida com o uso de uma maior vazão da fase móvel e/ou uma fase móvel mais concentrada. Contudo, uma maior vazão da fase móvel provoca um aumento da pressão do sistema cromatográfico e concentrações mais altas acarretam no aumento da linha base e, conseqüentemente, pior limite de detecção é obtido. Embora suposições possam ser feitas na tentativa de elucidar os sinais não identificados nas amostras de antimoniato de meglumina, cabe ressaltar que, a confirmação exata destas espécies somente pode ser efetuada com o emprego da espectrometria de massa acoplada a ionização por electrospray.

Após, o tratamento estatístico foi aplicado para comparação das médias obtidas por HG-CT-AAS e LC-ICP-MS para a determinação de As(V) na forma inorgânica. A análise dos dados mostrou que as médias obtidas não apresentam diferença significativa, já que o valor do *t*-estatístico (0,53) não foi superior ao valor

do *t*-crítico bi-caudal (2,78). Desta forma, as duas metodologias fornecem resultados que não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

O limite de detecção para as espécies As(III), As(V), DMA, MMA, obtidos utilizando a técnica de LC-ICP-MS, foram de 0,09, 0,15, 0,14 e 0,15 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. Cabe destacar que, durante as análises por LC-ICP-MS, foi observado um significativo efeito de memória para a determinação de As. Desta forma, após a etapa de calibração do equipamento, foi necessário efetuar uma etapa de limpeza, através da injeção de água, o que aumenta o tempo de execução das análises.

4.3.9. Emprego da geração de hidretos acoplada à LC-ICP-MS

Para complementar os estudos empregando a LC-ICP-MS, a técnica de geração de hidretos foi utilizada com o objetivo de verificar se os sinais 1 e 2, não identificados anteriormente, seriam espécies catiônicas de As, como por exemplo arsenobetaina ou arsenoaçúcares, visto que o NaBH_4 utilizado como redutor não tem a capacidade de reduzir estas espécies. Desta forma, um sistema em fluxo contínuo para a geração de hidretos foi montado após a saída da coluna cromatográfica. Inicialmente, foi otimizada a concentração de NaBH_4 utilizada para a formação das espécies voláteis de As em HCl 1 mol l^{-1} . A faixa de concentração de NaBH_4 avaliada foi de 0,1 a 1% (m/v), estabilizada pela adição de NaOH 0,02% (m/v) (Figura 37). As condições iniciais aplicadas foram de acordo com procedimentos descritos na literatura e o conhecimento prévio para execução de procedimentos experimentais efetuados para a determinação de As em outros tipos de amostras.

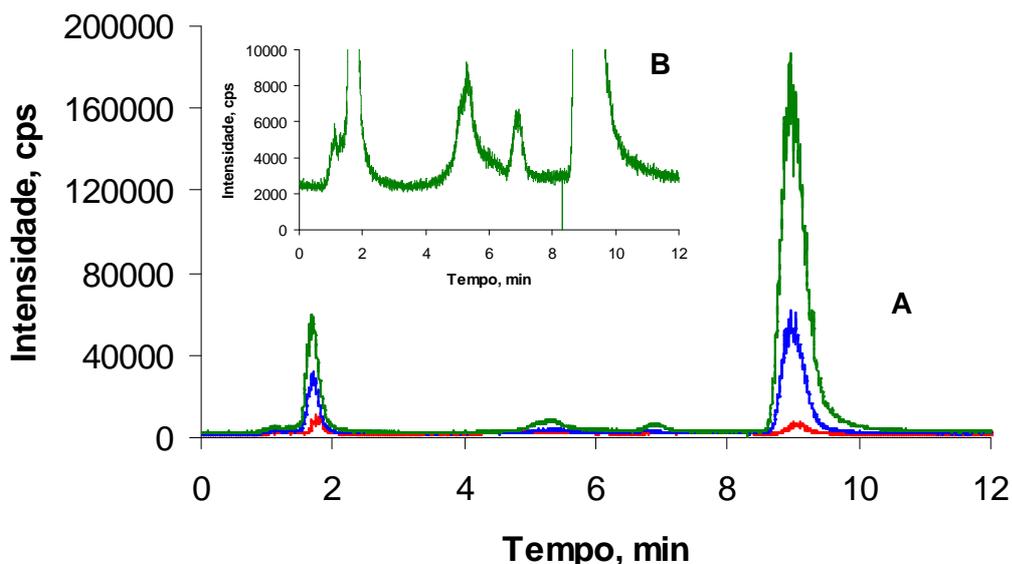


Figura 37. Sobreposição dos cromatogramas obtidos empregando a técnica de LC-ICP-MS para a injeção de 200 μl da amostra (**Lote A**) 50 vezes diluída durante a otimização da concentração de NaBH_4 para a técnica de geração de hidretos, onde as cores representam as concentrações de NaBH_4 de (—) 0,1%, (—) 0,5% e (—) 1% (**A**). Em **B** é representada uma ampliação do cromatograma obtido para o uso de NaBH_4 1% (m/v).

Mesmo com o uso da geração de hidretos, foi observada a formação dos sinais 1 e 2, não identificados anteriormente. Neste sentido, é possível afirmar que as espécies não identificadas não são compostos orgânicos de As, mas sim, possivelmente, complexos formados entre o As(V) na forma inorgânica em solução e a meglumina. Contudo, o perfil cromatográfico foi, ligeiramente, alterado e foi verificado um alargamento dos sinais 1 e 2. Por isso, o uso da geração de hidretos acoplada à LC-ICP-MS pode induzir a obtenção de resultados equivocados para a determinação de As(III) na forma inorgânica, visto que a integração do sinal para As(III) pode ser feita, de forma incorreta, juntamente com os sinais 1 e 2, acarretando em erros de elevada magnitude para a concentração final de As(III) na forma inorgânica. Além disso, o emprego de HCl na técnica de geração de hidretos promoveu um aumento na linha base devido à formação do íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ (m/z 75), o que reduz a possibilidade de determinação de espécies de As em baixas concentrações.

4.3.10. Alterações no programa de eluição para aumentar a eficiência de separação dos sinais obtidos

Alterações foram efetuadas nos programa de eluição para que uma maior eficiência de separação fosse obtida e, com isso, a etapa de integração posterior dos sinais fosse mais simples. Contudo, não foi possível obter uma eficiência de separação adequada, principalmente para as espécies de As(V) na forma inorgânica complexada por compostos orgânicos de característica catiônica. Desta forma, como anteriormente mencionado, a integração dos dois primeiros sinais, juntamente com o sinal do As(III) na forma inorgânica, deve ser resolvida com o emprego de ferramentas matemáticas.

Uma separação eficiente das espécies de As pode ser alcançada com o emprego de duas colunas cromatográficas (catiônica e aniônica), visto que as espécies presentes no medicamento analisado são de características catiônica e aniônica. Na Figura 38 é mostrado o cromatograma com a máxima eficiência de separação alcançada através de modificações no tempo e concentração da fase móvel. O programa de tempo de eluição na etapa de separação foi de: 1 min empregando 6 mmol l^{-1} (com tempo de rampa de 0,5 min) e 13 min empregando 30 mmol l^{-1} (com tempo de rampa de 0,5 min) utilizando $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ como fase móvel na concentração de 30 mmol l^{-1} .

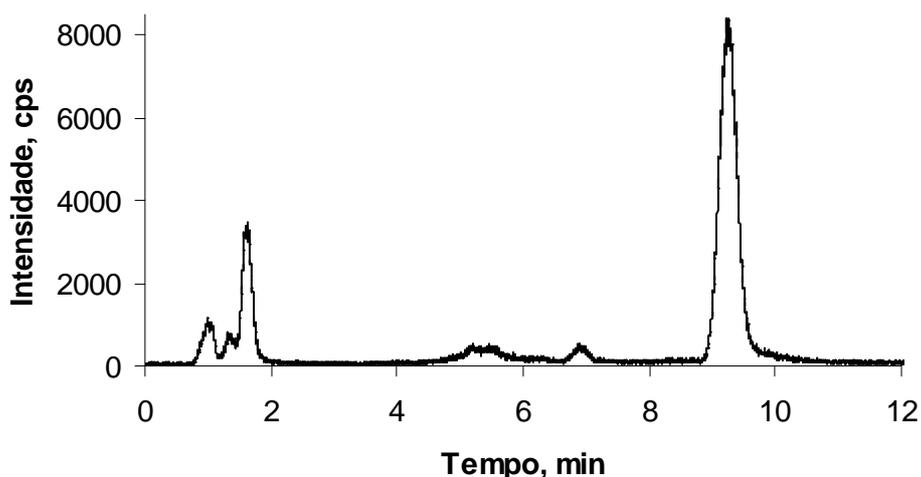


Figura 38. Perfil do cromatograma obtido para a injeção de $200 \mu\text{l}$ da amostra (Lote A) 150 vezes diluída com água na tentativa de aumentar a eficiência de separação dos sinais.

Embora as modificações efetuadas tenham proporcionado uma melhoria na eficiência de separação, ainda assim, a separação entre as espécies de As(III) na forma inorgânica, As(V) complexado às espécies orgânicas presentes na matriz do medicamento, não foi suficiente para a completa separação das espécies. Entretanto, os sinais foram integrados, quantificados e uma boa correlação foi obtida analisando os resultados para o arsênio total.

4.4. COMPARAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DAS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO

A proposta inicial deste trabalho abordou, fundamentalmente, o emprego do procedimento para a análise de especiação de As em amostras biológicas e medicamentos por HG-CT-AAS. No caso da análise de especiação em material biológico, procurou-se propor uma metodologia adequada utilizando a amostragem direta de suspensão, visto que a etapa de tratamento da amostra poderia ser, substancialmente, reduzida e, com isso, menor probabilidade de contaminação e conversão das espécies de As poderiam ser observadas. Embora o procedimento seja uma alternativa de menor custo se comparado às demais técnicas empregadas para a análise de especiação, os resultados obtidos não permitiram a sua implementação imediata.

Outros fatores podem ainda ser investigados e esclarecidos na tentativa de eliminar as interferências encontradas em fase aquosa. Ademais, o procedimento apresentou limites de detecção adequados para a análise de especiação de As sendo adequado para a quantificação deste elemento em baixas concentrações. A limitação do procedimento foi vinculada ao fato de que apenas quatro espécies de As (As, MMA, DMA e TMAO) puderam ser determinadas. Em contrapartida, a geração seletiva de hidretos permitiu a quantificação destas espécies de acordo com o respectivo estado de oxidação. A técnica de LC-ICP-MS possui capacidade de separação e detecção de um número maior de espécies de As. No entanto, uma etapa prévia de pré-tratamento deve ser efetuada, como por exemplo, extração com emprego de solvente orgânico seguida de filtração. Além disso, para a determinação de várias espécies de As utilizando a LC-ICP-MS, pode ser necessário utilizar diferentes colunas cromatográficas para separação das espécies, e

consequentemente, diferentes condições cromatográficas, que por sua vez, impede que seja aplicado um único procedimento de quantificação de todas as espécies simultaneamente.

Para a análise de especiação de As em medicamentos, o procedimento de HG-CT-AAS apresentou resultados satisfatórios, embora neste tipo de amostra tenha sido encontrado apenas As na forma inorgânica. Entretanto, a capacidade de contornar os problemas observados pela elevada presença de Sb na matriz do medicamento, os baixos limites de detecção alcançados e o reduzido custo de análise, tornam o procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS competitivo frente às demais técnicas, frequentemente, utilizadas para a análise de especiação. Cabe ressaltar que, o emprego da técnica de LC-ICP-MS, em relação aos resultados alcançados por HG-CT-AAS, permitiu que fosse feita a elucidação da forma com que o As está presente no medicamento. Além disso, os dois procedimentos apresentaram resultados concordantes, em um nível de confiança de 95%, de acordo com a análise estatística aplicada.

A Tabela 15 resume as principais características relacionadas às figuras de mérito das técnicas de HG-CT-AAS e LC-ICP-MS, em relação ao tipo de amostra investigada.

Tabela 15. Parâmetros avaliados para a comparação das técnicas empregadas para a análise de especiação de As.

Parâmetro	HG-CT-AAS	LC-ICP-MS
Técnica de detecção	AAS	ICP-MS
Modo de separação	CT-GC	LC
Espécies determinadas	iAs, MMA, DMA, TMAO	iAs, MMA, DMA
Identificação do estado de oxidação	HG seletiva	separação cromatográfica
Pré-tratamento	redução	nenhum
Custo de análise	baixo	relativamente alto
Limitação	somente compostos voláteis	propriedades cromatográficas
Frequência analítica	6 amostras h ⁻¹	3 amostras h ⁻¹
Formas de calibração	calibração para cada espécie	espécie única
Faixa linear	100 µg l ⁻¹	1000 mg l ⁻¹
Interferências	em fase gasosa e fase líquida	espécies poliatômicas e efeito espaço/carga
Material biológico (suspensão)		
LOD (3σ), µg g ⁻¹	0,11 iAs(III) e 0,15 iAs(V)	Não aplicada
LOQ, µg g ⁻¹	0,33 iAs(III) e 0,45 iAs(V)	Não aplicada
RSD, %	< 2,5	Não aplicada
Recuperação, %	Aproximadamente 75%	Não aplicada
Medicamento		
LOD (3σ), µg l ⁻¹	0,09 iAs(III) e 0,11 iAs(V)	0,09 As(III) e 0,15 iAs(V)
LOQ, µg l ⁻¹	0,27 iAs(III) e 0,33 iAs(V)	0,30 iAs(III) e 0,45 iAs(V)
RSD, %	< 2,5	< 5
Recuperação, %	Superior a 95%	Superior a 95%

De acordo com a Tabela 15 fica evidente a capacidade do procedimento de HG-CT-AAS para a análise de especiação de As. Além disso, os limites de detecção alcançados foram muito próximos dos limites de detecção empregando a técnica de LC-ICP-MS. Cabe ressaltar, a maior frequência analítica do procedimento proposto, menor custo operacional e elevada capacidade de contornar problemas relacionados à presença de interferentes. Desta forma, o procedimento proposto para a análise de especiação de As em medicamentos por HG-CT-AAS pode ser uma alternativa que permite a análise de especiação empregando a AAS como técnica de detecção.

CONCLUSÕES

Inicialmente, os parâmetros envolvidos na eficiência de separação das espécies de As estudadas do procedimento de HG-CT-AAS foram avaliados. Desta forma, alterações no programa de tempo (FIAS), corrente aplicada para o aquecimento da resistência, dimensões e o material da constituição do tubo em “U” foram investigados. O emprego de banho de gelo no GLS foi necessário para, assim, evitar a formação de gelo no interior do tubo em “U”. Após estas otimizações, uma amostra de fígado de frango foi utilizada no procedimento de análise de especiação de As por HG-CT-AAS com amostragem direta de suspensão. O emprego de suspensões com concentrações superiores a 10% (m/v), provocou a formação excessiva de espuma no GLS, mesmo com o uso de anti-espumante. Então, a adição de Triton X-100 foi necessária para garantir uma melhor distribuição das partículas sólidas em solução.

Embora uma boa eficiência de separação das espécies de As na forma inorgânica, MMA, DMA e TMAO tenha sido alcançada, o procedimento de análise de especiação de As com amostragem direta de suspensão por HG-CT-AAS não foi adequado, visto que foram observadas interferências em fase líquida. Desta forma, recuperações não quantitativas da solução de referência adicionada à amostra, previamente à análise, foram obtidas (cerca de 70%). Com o objetivo de aumentar a recuperação, foi feita a adição de TMAH 5% (m/v) na suspensão da amostra 10% (m/v), entretanto, as recuperações obtidas foram, cerca de, 5% maiores quando comparadas ao procedimento sem o emprego de TMAH. Para verificar a exatidão do procedimento proposto, uma etapa de extração com H_3PO_4 foi efetuada, mas a concentração de As na suspensão 10% (m/v) foi inferior ao LOD do procedimento de extração.

Apesar dos estudos de recuperação ficarem próximos a 70%, a resolução de separação, capacidade de identificação do estado de oxidação e o LOD obtido para as espécies de As estudadas são aspectos que devem ser considerados para o emprego do procedimento como uma possível alternativa para a análise de especiação de As. Cabe destacar que a exatidão do procedimento foi verificada com o emprego de CRMs (SLRS-4 *River water reference material for trace metals*, CASS-4 *Nearshore seawater reference material for trace metals* e NASS-5 *Open ocean*

seawater reference material for trace metals) e os resultados obtidos foram concordantes com a concentração total de As certificada e com a concentração das demais espécies de As determinadas nas mesmas amostras por HG-CT-AAS, em outro trabalho.

O procedimento de HG-CT-AAS foi, também, empregado para a análise de especiação de As em antimoniato de meglumina. Contudo, modificações no procedimento foram necessárias para minimizar a interferência de Sb na determinação de As. A redução do sinal de fundo foi avaliada com o emprego de ácido cítrico na concentração de até 10% (m/v). No entanto, a redução do sinal de fundo observada não foi significativa. Adicionalmente, a adição de ácido cítrico aumentou os valores dos brancos e alterou o pH da reação reduzindo a eficiência de geração da arsina. O emprego de uma maior vazão de hidrogênio e oxigênio, juntamente, com o uso de uma válvula, posicionada previamente ao atomizador, foram efetivos para a eliminação da presença do interferente.

Desta forma, foi possível aplicar o procedimento para a determinação de As(III) e As(V) na forma inorgânica nas amostras do medicamento. Ademais, os resultados obtidos foram comparados com a determinação da concentração de As total por ICP-MS e a concentração de As(III) e As(V) na forma inorgânica por LC-ICP-MS. De acordo com a avaliação estatística (teste-*t*), os resultados foram concordantes para um nível de confiança de 95%. A análise de especiação por LC-ICP-MS mostrou que parte do teor da espécie de As(V), na forma inorgânica, estava complexada com compostos presentes na matriz do medicamento, possivelmente, meglumina. Ensaios de recuperação foram efetuados a partir da adição de uma solução com concentração conhecida das espécies de As(III) e As(V) na forma inorgânica, MMA e DMA. As recuperações para todas as espécies foram superiores a 90% e, além disso, os tempos de retenção das espécies presente na solução de referência foram comparados com as espécies presentes nas amostras. Os diferentes lotes do medicamento mostraram um perfil cromatográfico diferente, o que sugere a presença de constituintes diferentes de acordo com o lote analisado. O LOD obtido para o procedimento proposto foi de $0,11 \mu\text{g l}^{-1}$ para o As na forma inorgânica e, assim, foi possível fazer a determinação de As em baixas concentrações no medicamento. As recuperações quantitativas obtidas para as demais espécies de As (MMA, DMA e TMAO), presumem que o procedimento pode ser aplicado para a determinação destas espécies, embora estas não estejam

presentes nas amostras. O menor custo de análise, adequado LOD e a maior frequência analítica permitem que o procedimento de HG-CT-AAS seja classificado como um procedimento alternativo para a análise de especiação frente a outras técnicas clássicas como, por exemplo, LC-ICP-MS.

Sugestões para futuros trabalhos:

Para a obtenção de resultados mais conclusivos uma investigação mais detalhada deve ser feita para o melhor entendimento dos fenômenos de interferência em fase líquida com o emprego do procedimento de HG-CT-AAS para a análise de especiação de As em material biológico. Assim, estudos relacionando o tamanho de partícula e a concentração de outros metais presentes na suspensão poderiam ser fatores avaliados em futuros trabalhos. Adicionalmente, o emprego de condições mais drásticas (soluções ácidas, alcalinas e solventes orgânicos), juntamente com fontes alternativas de energia (micro-ondas e ultrassom), poderiam ser investigadas para o emprego da análise de especiação de As com amostragem direta de suspensão por HG-CT-AAS.

A aplicação do procedimento de HG-CT-AAS também deve ser avaliada para a análise de especiação de As em outros tipos de materiais biológicos. O efeito da diferença da constituição da matriz pode identificar a presença de interferentes específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acon, B. W., McLean, J. A., Montaser, A., A direct injection high efficiency nebulizer interface for microbore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 852-857.
2. Agterdenbos, J., Van Noort, J. P. M., Peters, F., Bax, D., Ter Heege, J. P., The determination of selenium with hydride generation AAS – I: Description of the apparatus used and study of the reactions in the absorption cuvette, *Spectrochim. Acta Part B* 40 (1985) 501-515.
3. 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.
4. Barin, J. S., Desenvolvimento de procedimentos alternativos de preparo e de determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos, Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2007.
5. Bendicho, C., Loos-Vollebregt, M. T. C., Solid Sampling in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Commercial Atomizers - A Review, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.
6. Brindle, I. D., Vapour-generation analytical chemistry: from Marsh to multimode sample-introduction system, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 735-741.
7. Burguera, M., Burguera, J. L., Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples, *Talanta* 44 (1997) 1581-1604.
8. Caballo-López, A., Luque de Castro, M. D., Slurry sampling-microwave assisted leaching prior to hydride generation-pervaporation-atomic fluorescence detection for the determination of extractable arsenic in soil, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2011-2017.
9. Cai, Y., Derivatization and vapor generation methods for trace element analysis and speciation, in: Sample preparation for trace element analysis (Mester, Z., Sturgeon, R., Ed.), Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XLI, Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 577-592.
10. Cal-Prieto, M. J., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J. M., López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada, D., Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS). A literature review from 1990 to 2000, *Talanta* 56 (2002) 1-51.

11. Chen, F.-Y., Jiang, S.-J., Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of As, Cd, and Hg in cereals, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6564-6569.
12. D'Ulivo, A., Battistini, S. S. T., Pitzalis, E., Zamboni, R., Mester, Z., Sturgeon, R. E., Effect of additives on the chemical vapour generation of bismuthane by tetrahydroborate(III) derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 783-791.
13. D'Ulivo, A., Baiocchi, C., Pitzalis, E., Onor, M., Zamboni, R., Chemical vapor generation for atomic spectrometry. A contribution to the comprehension of reaction mechanisms in the generation of volatile hydrides using borane complexes, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 471-486.
14. D'Ulivo, A., Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media. A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 793-825.
15. D'Ulivo, A., Dedina, J., Lampugnani, L., Selecká, A., Mechanism of atomization interferences by oxygen at trace level in miniature flame hydride atomizers, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 1270-1279.
16. D'Ulivo, A., Dedina, J., The relation of double peaks, observed in quartz hydride atomizers, to the fate of free atoms in the determination of arsenic and selenium by atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2069-2079.
17. D'Ulivo, A., Lampugnani, L., Faraci, D., Tsalev, D. L., Zamboni, R., Elimination of hydrofluoric acid interference in the determination of antimony by the hydride generation technique, *Talanta* 45 (1998) 801-806.
18. D'Ulivo, A., Loreti, V., Onor, M., Pitzalis, E., Zamboni, R., Chemical vapor generation atomic spectrometry using amineboranes and cyanotrihydroborate (III) reagents, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2591-2600.
19. D'Ulivo, A., Mester, Z., Meija, J., Sturgeon, R. E., Mechanism of generation of volatile hydrides of trace elements by aqueous tetrahydroborate(III). Mass spectrometric studies on reaction products and intermediates, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3008-3015.
20. D'Ulivo, A., Mester, Z., Sturgeon, R. E., The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 423-438.
21. D'Ulivo, A., Onor, M., Pitzalis, E., Role of hydroboron intermediates in the mechanism of chemical vapor generation in strongly acidic media, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6342-6352.

22. Davis, R. E., Brown, Hopmann, R., Kibby, C. L., A rapid and quantitative exchange of the boron hydrogens in trimethylamine borane with D₂O, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 487.
23. Dedina, J., Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 846-872.
24. Dedina, J., D'Ulivo, A., Argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion micro flame – a new hydride atomizer, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1737-1746.
25. Dedina, J., D'Ulivo, A., Lampugnani, L., Matousek, T., Zamboni, R., Selenium hydride atomization, fate of free atoms and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1777-1790.
26. Dedina, J., Flow methods in gas-liquid separations, in: Flow analysis with atomic spectrometric detection (Sanz-Medel, A., Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1999, p. 237-273.
27. Dedina, J., Matousek T., Multiple microflame – a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 301-304.
28. Dedina, J., Rubeska, I., Hydride atomization in a cool hydrogen-oxygen flame burning in a quartz tube atomizer, *Spectrochim. Acta Part B* 35 (1980) 119-128.
29. Dedina, J., Tsalev, D. L., Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, Volume 130, John Wiley & Sons, England, 1995, a) p. 18-28, b) p. 45-62, c) p. 91-117, d) p. 183-205.
30. Dedina, J., Welz, B., Quartz tube atomizer for hydride generation atomic absorption spectrometry: fate of free arsenic atoms, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 301-314.
31. Del Razo, L. M., Styblo, M., Cullen, W. R., Thomas, D. J., Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174 (2001) 282-293.
32. Demicheli, C., Ochoa, R., Lula, I. V., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Frézard, F., Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate, *Appl. Organometal. Chem.* (2003) 226-231.
33. Devesa, V., Del Razo, L. M., Adair, B., Drobna, Z., Waters, S. B., Hughes, M., Styblo, M., Thomas, D. J., Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 1460-1467.
34. Diaz-Bone, R. A., Hitzke, M., Multi-element organometal(loid) speciation by hydride generation-GC-ICP-MS: overcoming the problem of species-specific optima by using a pH-gradient during derivatisation, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 861-870.

35. Dilda, P. J., Hogg, P. J., Arsenical-based cancer drugs, *Cancer Treat. Rev.* 33 (2007) 542-564.
36. Duarte, F. A., Pereira, J. S. F., Barin, J. S., Mesko, M. F., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Knapp, G., Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 24 (2009) 224-227.
37. Duarte, F. A., Pereira, J. S. F., Mesko, M. F., Godschmidt, F., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Evaluation of liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation in water from industrial treatment of shale, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 978-984.
38. Ebdon, L., Fisher, A. S., Betti, M., Leroy, M., Detection methods for the quantitation of trace elements, in: Sample preparation for trace element analysis (Mester, Z., Sturgeon, R., Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XLI*, Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 127-128.
39. Fang, Z., Flow injection separation and preconcentration, Verlagsgesellschaft, Germany, 1993, p. 1-19.
40. Feng, Y.-L., Sturgeon, R. E., Lam, J. W., Chemical vapor generation characteristics of transition and noble metals reacting with tetrahydroborate(III), *Anal. Chem.* 75 (2003) 635-640.
41. Florea, A.-M., Busselberg, D., Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling, *Neurotoxicology* 30 (2009) 803-810.
42. Flores, E. M. M., da Silva, L. L. C., Barin, J. S., Saidelles, A. P. F., Zanella, R., Dressler, V. L., Paniz, J. N. G., Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1883-1891.
43. Flores, E. M. M., Nunes, A. M., Dressler, V. L., Dedina, J., Multiple microflame quartz tube atomizer: Study and minimization of interferences in quartz tube atomizers in hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 173-178.
44. Flores, E. M. M., Silva, F. E. B., Santos, E. P., Paula, F. R., Barin, J. S., Zanella, R., Dressler, V. L., Bittencourt, C. F., Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb(V) as N-methylglucamine antimonite, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2095-2102.
45. Francesconi, K. A., Tanggaard, R., McKenzie, C. J., Goessler, W., Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar, *Clin. Chem.* 48 (2002) 92-101.

46. Geng, W., K., R., ohta, T., Nakajima, T., Takanashi, H., Ohki, A., Arsenic speciation in marine product samples: Comparison of extraction-HPLC method and digestion-cryogenic trap method, *Talanta* 79 (2009) 369-375.
47. Goessler, W., Kuehnelt, D., Sample preparation for arsenic speciation, in: Sample preparation for trace element analysis (Mester, Z., Sturgeon, R., Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume XLI, Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 1027-1044.
48. Gong, Z., Lu, X., Cullen, W. R., Le, X. C., Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 1409-1413.
49. Grüter, U. M., Hitzke, M., Kresimon, J., Hirner, A.V., Derivatization of organometal(loid) species by sodium borohydride Problems and solutions, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 225–236.
50. Gunes, D. A., Florea, A.-M., Spletstoesser, F., Busselberg, D., Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity, *Neurotoxicology* 30 (2009) 194-202.
51. Gurleyuk, H., Tyson, J. F., Uden, P. C., Determination of extractable arsenic in soils using slurry sampling-on-line microwave extraction-hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 935-942.
52. Haswell, S. J., Mendham, J., Butler, M. J., Smith, D. C., Determination of arsenic in solid samples by cold acid solubilisation – Hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 3 (1988) 731-734.
53. Hindmarsh, J. T., McCurdy, R. F., Savory, J., Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 23 (1986) 315-347.
54. Hirata, S., Toshimitsu, H., Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS, *Appl. Organometal. Chem.* 21 (2007) 447-454.
55. Holak, W., Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry, *Anal. Chem.* 31 (1969) 1712-1713.
56. Howard, A. G., (Boro)hydride techniques in trace element speciation, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (1997) 267-272.
57. Howard, A. G., Salou, C., Arsenic speciation by criogenic trap hydride generation atomic absorption spectrometry: performance enhancement by pre-derivatization, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 13 (1998) 683-686.

58. Howard, A. G., Salou, C., Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydrides AAS determination of dissolved arsenic species, *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 89-96.
59. <http://www.nrdc.org/water/drinking/qarsenic.asp> (acessado em 22/06/2009 às 14:30 h.)
60. Huang, J., Hu, X., Zhang, J., Li, K., Yan, Y., Xu, X., The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharmaceut. Biomed.* 40 (2006) 227-234.
61. Junior, D. S., Krug, F. J., Amostragem de suspensões, em: Métodos de Preparo de Amostras (Krug, F. J., Ed.), 1ª ed., Seção Técnica de Biblioteca – CENA/USP, 2008, p. 129-135.
62. Kaise, T., Yamamuchi, H., Hirayama, Y., Fukui, Determination of inorganic arsenic and organic arsenic compounds in marine organisms by hydride generation/cold trap/gas chromatography-mass spectrometry, *Appl. Organometal. Chem.* 2 (1998) 339-347.
63. Karadjova, I. B., Petrov, P. K., Serafimovski, I., Stafilov, T., Tsalev, D. L., Arsenic in marine tissues – The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 258-268.
64. Kreevoy, M. M., Hutchins, J. E. C., Acid-catalyzed hydrolysis and isotope exchange in LiBH_3CN , *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 4329-4330.
65. Kumar, A. R., Riyazuddin, P., Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 29 (2009) 166-176.
66. Kumar, A. R., Riyazuddin, P., Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1401-1410
67. Laborda, F., Bolea, E., Baranguan, M. T., Castillo, J. R., Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over?, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 797-802.
68. LaCourse, Column liquid chromatography: Equipment and instrumentation, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2813-2831.
69. Lindemann, T., Prnage, A., Dannecker, W., Neidhart, B., Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 214-220.
70. Liu, B. H., Li, Z. P., A review: Hydrogen generation from borohydride hydrolysis reaction, *J. Power Sources* 187 (2009) 527-534.

71. Marafante, E., Vahter, M., Norin, H., Envall, J., Sandstrom, M., Christakopoulos, A., Ryhage, R., Transformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man, *J. Appl. Toxicol.* 7 (1987) 111-117.
72. Matousek, T., Dedina, J., Fate of free selenium atoms in externally heated quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry and their reatomization at tube ends studied by means of the determination of longitudinal free atom distribution, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 545-557.
73. Matousek, T., Dedina, J., Frech, W., On-line atomization of selenium hydride in graphite furnace: mechanism and interferences, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1323-1329.
74. Matousek, T., Dedina, J., Selecká, A., Multiple microflame quartz tube atomizer – further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 451-462.
75. Matousek, T., Hernández-Zavala, A., Svoboda, M., Langrová, L., Adair, B. M., Drobná, Z., Thomas, D. J., Styblo, M., Dedina, J., Oxidation state specific generation arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 396-406.
76. Matusiewicz, H., Chemical vapor generation with slurry sampling: A review of atomic absorption applications, *Appl. Spectrosc. Rev.* 38 (2003) 263-294.
77. Matusiewicz, H., Mroczkowska, M., Hydride generation from slurry samples after ultrasonication and ozonation for the direct determination of trace amounts of As(III) and total inorganic arsenic by their in situ trapping followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 751-761.
78. Matusiewicz, H., Slachcinski, M., Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES), *Microchem. J.* 82 (2006) 78-85.
79. McSheehy, S., Szpunar, J., Morabito, R., Quevauviller, P., The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 191-209.
80. Meija, J., D'Ulivo, A., Solution to nascent hydrogen challenge, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 771-772.
81. Messmer, R. E., Jolly, W. L., The exchange of deuterium with solid potassium hydroborate, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 2039-2042.

82. Michalke, B., Quality-control in speciation investigations, *Fresenius Anal. Chem.* 350 (1994) 2-6.
83. Michalke, B., The coupling of LC to ICP-MS in element speciation – Part II Recent trends in application, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 154-165.
84. Michalke, B., The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 142-153.
85. Mierzwa, J., Dobrowolski, R., Slurry sampling hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of extractable/soluble As in sediment samples, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 117-122.
86. Miyashita, S., Shimoya, M., Kamidate, Y., Kuroiwa, T., Shikino, O., Fujiwara, S., Francesconi, K. A., Kaise, T., Rapid determination of arsenic species in freshwater organisms from arsenic-rich Hayakawa river in Japan using HPLC-ICP-MS, *Chemosphere* 75 (2009) 1065-1073.
87. Montes-Bayón, M., DeNicola, K., Caruso, J. A., Liquid chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457-476.
88. Moreda-Pineiro, A., Pena-Vazquez, E., Hermelo-Herbello, P., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Pineiro, J., Alonso-Rodríguez, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., Matrix Solid-phase dispersion as a sample pretreatment for the speciation of arsenic in seafood products, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9272-9278.
89. Moreda-Pineiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D., Direct As, Bi, Ge, Hg and Se(IV) cold vapor/hydride generation from coal fly ash slurry samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895.
90. Mussil, S., Matousek, T., On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 685-691.
91. Narsito, J. A., Santosa, S. J., Study of processes in the hydride generation atomic-absorption spectrometry of antimony, arsenic and selenium, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 189-199.
92. Nóbrega, J. A., Santos, M. C., de Souza, R. A., Cadore, S., Barnes, R., Tatro, M., Sample preparation in alkaline media, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 465-495.
93. Okina, M., Yoshida, K., Kuroda, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S., Endo, G., Determination of trivalent methylated arsenicals in rat urine by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after solvent extraction, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 799 (2004) 209-215.

94. Palácios, M. A., Gómez, M., López, 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.
95. Paula, F. R., Metodologia para a determinação de antimônio (III) por FI-HG AAS em antimoniais pentavalentes empregados para o tratamento da Leishmaniose, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas (PPGCTF), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2002.
96. Pavageau, M. P., Krupp, E., de Diego, A., Pécheyran, C., Donard, O. F. X., Cryogenic trapping for speciation analysis, in: Sample preparation for trace element analysis (Mester, Z., Sturgeon, R., Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume XLI, Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 495-531.
97. Pergantis, S. A., Winnik, W., Heithmar, E. M., Cullen, W. R., Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry, *Talanta* 44 (1997) 1941-1947.
98. PerkinElmer SCIEX, ELAN, versão 3.3, Inductively coupled plasma spectrometer – software guide, 2005.
99. Pizarro, I., Gómez, M., Câmara, C., Palácios, M. A., Arsenic speciation in environmental and biological samples – Extraction and stability studies, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 85-98.
100. Planer-Friedrich, B., Wallschläger, D., A critical investigation of hydride generation-based arsenic speciation in sulfidic waters, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 5007-5013.
101. 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.
102. Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., Determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in environmental reference materials as acid slurries by on-line hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253.
103. Roger, L. J., McLaughlin, J., Brindle, I. D., A new sample introduction system for atomic spectrometry combining vapour generation and nebulization capacities, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1540-1548.

104. Rollig, C., Illmer, T., The efficacy of arsenic trioxide for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: A systematic review, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 425-430.
105. Santos, C., Alava-Moreno, F., Lavilla, I., Bendicho, C., Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 987-994.
106. Sanz, E., Munoz-Olivas, R., Cámara, C., A rapid novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 227-235.
107. Sanz-Asensio, J., Martinez-Soria, M. T., Plaza-Medina, M., Pérez Clavijo, M., Determination of monomethylarsenous acid by hydride generation – gas phase molecular absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 331-339.
108. Silva, F. E. B., Determinação de arsênio por HG AAS em amostras de antimoniais pentavalentes usados no tratamento da Leishmaniose, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas (PPGCTF), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2002.
109. Sneddon, J.; Hardaway, C.; Bobbadi, K. K.; Reddy, A. K.; Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy - an overview and selected recent applications, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 1-14.
110. Sturgeon, R. E., Guo, X., Mester, Z., Chemical vapor generation: are further advances yet possible?, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 881-883.
111. Sturgeon, R. E., Mester, Z., Analytical applications of volatile metal derivatives, *Appl. Spectrosc.* 56 (2002) 202A-213A.
112. Sturgeon, R., Vapor generation for atomic spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 733-734.
113. Sun, Y. C., Lee, Y. S., Shiah, T. L., Lee, P. L., Tseng, W. C., Yang, M. H., Comparative study on conventional and low-flow nebulizers for arsenic speciation by means of microbore liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 207-213.
114. Suzuki, Y., Shimoda, Y., Endo, Y., Hata, A., Yamanaka, K., Endo, G., Rapid and effective speciation analysis of arsenic compounds in human urine using anion-exchange columns in HPLC-ICP-MS, *J. Occup. Health* 51 (2009) 380-385.

115. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., Lobinsky, 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.
116. Thomas, D. J., Styblo, M., Lin, S., The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176 (2001) 127-144.
117. Tian, Y., Chen, M.-L., Chen, X.-W., Wang, J.-H., Hirano, Y., Sakamoto, H., Setsu, I., Arsenic speciation with gradient hydride generation interfacing liquid chromatography and atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 48-54.
118. Torres, D. P., Vieira, M. A., Ribeiro, A. S., Curtius, A. J., Slurry sampling for arsenic determination in sediments by hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 728-732.
119. Tsalev, D. L., Sperling, M., Welz, B., Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsonate and dimethylarsinate and high-performance liquid chromatographic separation of their L-cysteine complexes, *Talanta* 51 (2000) 1059-1068.
120. Tsalev, D. L., Vapor generation or electrothermal atomic absorption spectrometry? – Both!, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 917-933.
121. Vassileva, E., Baeten, H., Hoenig, M., Discussion of parameters associated with the determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry in slurried environmental samples, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 159-165.
122. Verstovsek, S., Estrov, Z., Arsenic derivatives as therapeutic agents for hematologic malignancies, *Leukemia Res.* 28 (2004) 901-903.
123. Verstovsek, S., Estrov, Z., Arsenic derivatives as therapeutic agents for hematológica malignancies, *Leukemia Res.* 28 (2004) 901-903.
124. Vieira, M. A., Welz, B., Curtius, A. J., Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2057-2067.
125. Walcerz, M., Bulska, E., Hulanicki, A., Study of some interfering processes in the arsenic, antimony, and selenium determination by hydride atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 622-626.
126. Weber, G., Investigation of the stability of metal species with respect to liquid-chromatographic separations, *Fresenius Anal. Chem.* 346 (1993) 639-642.

127. Welz, B., Melcher, M., Mechanisms of transition-metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry. 1. Influence of cobalt, copper, iron and nickel on selenium determination, *Analyst* 109 (1984) 569-572.
128. Welz, B., Sperling, M., Atomic absorption spectrometry, third edition, Wiley-VHC Verlag, Germany, 1999, a) p. 49-51, b) p. 203-209, c) p. 440-468.
129. World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/en/>, acessado dia 29/12/2009. World Health organization, Environmental Health Criteria 224: Arsenic and arsenic compounds. 2nd ed. Genebra, Suíça, 2001, 501 p.
130. Xi, S., Jin, Y., Lv, X., Sun, G., Distribution and speciation of arsenic by transplacental and early life exposure to inorganic arsenic in offspring rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 134 (2010) 84-97.
131. Yan, X.-P., Ni, Z.-M., Vapor generation atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 291 (1994) 89-105.
132. Yehiayan, L., Pattabiraman, M., Kavallieratos, K., Wang, X., Boise, L. H., Cai, Y., Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites, *Talanta* 24 (2009) 1397-1405.
133. Zavala-Hernández, A., Matousek, T., Drobná, Z., Paul, D. S., Walton, F., Adair, B. M., Dedina, J., Thomas, D. J., Stýblo, M., Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer), *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 342-351.
134. Zavala-Hernández, A., Valenzuela, O. L., Matousek, T., Drobná, Z., Dedina, J., Garcia-Vargas, G. G., Thomas, D. J., Del Razo, L. M., Styblo, M., Speciation of arsenic in exfoliated urinary bladder epithelial cells from individuals exposed to arsenic in drinking water, *Environ. Health Persp.* 116 (2008) 1656-1660.
135. Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., Mulchopadhyay, R., Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 37445-37451.