UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO ORGÂNICO EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Domingues Mörschbächer

Santa Maria, RS, Brasil
2006

INVESTIGAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO ORGÂNICO EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

por

Vanessa Domingues Mörschbächer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em
Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química.

Orientador: Prof^{a}. Dr^{a}. Denise Bohrer do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

INVESTIGAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO ORGÂNICO EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

elaborada por
Vanessa Domingues Mörschbächer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____
Denise Bohrer do Nascimento, Dr^{a}.
(Presidente/Orientador)

_____
Solange Cristina Garcia Pomblum, Dr^{a}. (UFSM)

_____
Márcia Messias da Silva, Dr^{a}. (UFSM)

Santa Maria, 21 deJunho de 2006.

Primeiramente a Deus, pela oportunidade de vida, pelas conquistas.

Aos meus Pais, Angélio Mörschbächer e Zildenir Domingues Mörschbächer pelo esforço, carinho, apoio, dedicação, e pelo grande incentivo de luta.

Às minhas irmãs, Deborah Domingues Mörschbächer e Priscilla Domingues Mörschbächer, pelo amor, preocupação e carinho.
À minha sobrinha Júlia Pascale Mörschbächer, que na inocência de criança, transmite amor, afeto e alegria.

Ao Juarez Iensen Pedroso Filho, que se fez um companheiro extremamente importante, incentivador e amigo.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dra. Denise Bohrer, Dr. Paulo Cícero do Nascimento e Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela oportunidade de aprendizado e pela confiança.

Aos colegas de Laboratório Adrian Ramirez, Cristiane Jost, Denise Bertagnolli, Luciana DeL Fabro, Mareni Pauletto, Marieli Marques, Maurício Hilgemann, Sandra Oliveira, Cristiane Spengler, Raquel Stefanello, Emilene Becker, Simone Noremberg, Michele Sauer, Gisele Martins, Daiane Dias, Marcos Guterres, Júlia Garmatz, Daniele Correa, Joselito Trevisan pelo convívio, pelos ensinamentos e pela colaboração.

A todos os professores e funcionários que contribuíram de alguma maneira para o bom desenvolvimento deste trabalho.

A UFSM pela oportunidade da realização deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

INVESTIGAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO ORGÂNICO EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

AUTORA: VANESSA DOMINGUES MÖRSCHBÄCHER
ORIENTADOR: DR[A] DENISE BOHRER DO NASCIMENTO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de junho de 2006.

Nutrição Parenteral é a administração de nutrientes por meio intravenoso em pacientes que não podem consumi-los por via gastrointestinal.

Soluções de Nutrição Parenteral são armazenadas em embalagens de plástico e de vidro, sendo o vidro o mais utilizado devido à sua estrutura rígida, resistência química, facilidade de esterilização e transparência. Entre os vários constituintes do vidro, está o arsênio, na forma de As_2O_3 usado como agente de refino para promover a remoção das bolhas geradas no fundido.

O arsênio é altamente tóxico, contudo, sua toxicidade não é dependente apenas da sua concentração total, mas de suas formas químicas, pois das espécies inorgânicas, a arsina (AsH_3) é mais tóxica que o arsenito (As(III)) e, este, mais tóxico que o arsenato (As(V)). O arsênio é metilado no organismo alternando de estado de oxidação de arsênio pentavalente a arsênio trivalente e adição do grupo metil através de S-adenosilmetionina. Glutationa, e outros tióis, servem como agentes redutores, formando primeiramente o ácido monometil arsênico (MMA) e logo a seguir o ácido dimetil arsínico (DMA). Por isso a metilação é conhecida como um mecanismo de desintoxicação, mas estudos mostram que o MMA e DMA podem ser tanto quanto ou mais mutagênicos, carcinogênicos e citogênicos que os arsênios inorgânicos.

Estudos mostraram que quase todas as substâncias que fazem parte da constituição das formulações parenterais, como: soluções de aminoácidos, soluções salinas, glicose e heparinas, podem apresentar contaminação por arsênio (As(III e As(V)) sendo a embalagem de vidro a maior fonte de contaminação. As espécies de arsênio (As(III) e As(V)) podem ser lixiviados pela solução por diferentes mecanismos, sendo o processo de esterilização o fator determinante para que isso ocorra.

Devido às implicações toxicológicas em torno da presença de espécies de arsênio nos produtos é importante que se investigue possíveis transformações das espécies de arsênio durante o processo de esterilização das soluções de nutrição parenteral.

Neste trabalho, investigou-se a possibilidade de formação de arsênio orgânico (DMA(V) e MMA(V)), devido à reação de metilação das espécies de arsênio inorgânico por reação com as espécies orgânicas dos constituintes de tais soluções.

Para esta investigação foi necessária uma análise de especiação. A separação das espécies de arsênio (DMA(V), MMA(V) e As(V)) foi feita por cromatografia iônica, e a quantificação por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.

Devido à natureza complexa e à elevada concentração dos constituintes das matrizes a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico não foi possível, sendo necessária, portanto, uma etapa prévia de “clean up”.

Procedeu-se a esterilização em soluções de substâncias orgânicas que constituem as soluções de nutrição parenteral, como soluções de aminoácidos, glicose e vitaminas, com adição de arsênios inorgânicos e, através da comparação dos resultados entre as soluções esterilizadas e não esterilizadas não se observou a formação de espécies orgânicas de arsênio (DMA(V) e MMA(V)).

Realizou-se, assim, a especiação das espécies de arsênio (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em soluções comerciais constituintes das formulações parenterais e pode-se concluir que se há a formação de arsênio orgânico, as concentrações são muito baixas, sendo menores que os limites para arsênio permitidos pela farmacopéia.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

INVESTIGAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO ORGÂNICO EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

AUTORA: VANESSA DOMINGUES MÖRSCHBÄCHER
ORIENTADOR: DR[A] DENISE BOHRER DO NASCIMENTO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de junho de 2006.

Parenteral nutrition is the nutrients administration by intravenous mean in patients who cannot consume them for gastrointestinal way.

Parenteral Nutrition Solutions are stored in glass and plastic containers, being the glass the most used due to its rigid structure, chemical resistance, sterilization easiness and transparency. Among glass constituents is the arsenic, in form of As_2O_3, used as refining agent to promote bubbles removal generated in the casting one.

Arsenic is highly toxic. Its toxicity however is not dependent on its concentration only, but on its chemical form. Among inorganic species, arsine (AsH_3) is more toxic than arsenite (As(III)) which is, more toxic than the arsenate (As(V)). Arsenic is methylated in the organism alternating the oxidation state of arsenic pentavalent the trivalent. The methilation is known as a detoxification mechanism, but studies have been shown that forms of MMA and DMA may be as mutagenic, carcinogenic and cytogenic as the forms of inorganic arsenic, or even more.

Studies have been shown that most substances used in parenteral formulations, as: salts, amino acid, glucose and vitamins, can present Arsenic (As(III and As(V)) as contaminant. The species of Arsenic (As(III) and As(V)) can be present in the raw material or be leached from glass containers by different mechanisms, being the sterilization process the determinative factor for that this to occur.

Despite toxicological implications around the presence of species of Arsenic in these formulations it important to investigate the possible transformation of the species of arsenic during the sterilization process of parenteral nutrition solutions.

In this work, it was investigated the possibility of formation of organic arsenic species (DMA(V) and MMA(V)), due to methilation reaction of the arsenic inorganic species for reaction with the organic species of parenteral nutrition solutions.

The arsenic species separation (DMA(V), MMA(V) and As(V)) was carried out by ionic chromatography, and the quantification by hydride generation atomic absorption spectrometry.

Due to the complex nature of the matrix constituent the direct injection of the samples in the chromatographic system was not possible, being necessary, therefore, a "clean up" step was developed.

The sterilization procedure was carried out with solutions of amino acids, glucose and vitamins, with addition of inorganic arsenic species. The comparison of the results between sterilized and not sterilized solutions showed that arsenic organic species (DMA(V) and MMA(V)) were not formed in solution.

The arsenic speciation analysis (As(III), DMA(V), MMA(V) and As(V)) in commercial solutions of parenteral nutrition showed that if they contain organic arsenic, the concentration is very low, being lesser than the limit for arsenic allowed by pharmacopeias.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação dos tipos de vidro de acordo com a resistência hidrolítica. 7
TABELA 2 – Estrutura dos compostos de Arsênio. 10
TABELA 3 – Espécies de arsênio como contaminante em soluções parenterais comerciais.. 20
TABELA 5 - Substâncias usadas para o estudo da formação de As orgânico. 28
TABELA 6 - Concentração (g/L) dos aminoácidos em formulações comerciais. 29
TABELA 7 - Concentração (g/10 mL) das vitaminas em formulações comerciais. 30
TABELA 8 - Estudo da concentração da cisteína em várias concentrações de $NaBH_4$ para aumentar a sensibilidade da medida espectrométrica do DMA(V) Tempo de reação de 60 minutos. 32
TABELA 9 - Estudo da concentração da cisteína em várias concentrações de $NaBH_4$ para aumentar a sensibilidade da medida espectrométrica do MMA(V) Tempo de reação de 60 minutos. 33
TABELA 10 - Estudo do tempo necessário para que ocorra a reação de pré-redução do DMA(V) em várias concentrações de cisteína em $NaBH_4$ 2,0%. 33
TABELA 11 - Estudo das condições cromatográficas para a separção de As(III) e DMA(V), em solução de 10 $mg.L^{-1}$ utilizando $NH_4H_2PO_4$ como eluente e alça de amostragem de 20 µL. 35
TABELA 12 - Estudo das condições cromatográficas para a separção de MMA(V) e As(V), em solução de 10 $mg.L^{-1}$ utilizando como eluente$NH_4H_2PO_4$ em pH 6,0 e alça de amostragem de 20 µL. 37
TABELA 13 - Programas de vazão para a separação do As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V) em solução contendo 10 $mg.L^{-1}$ de cada espécie de As utilizando alça de amostragem de 20 µL. 37
TABELA 14 - Programas de vazão do As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V) em solução contendo 100 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécie de As utilizando alça de amostragem de 500 µL..... 39
TABELA 15 - pKa e estruturas dissociadas das espécies de As 41
TABELA 16 - Retenção de 10 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécies de As em função do pH de suas soluções em vazão de 0,5 $mL.min^{-1}$. 42
TABELA 17 - Variação da vazão para o estudo da retenção do As(III) em solução em pH 12,0. 43

TABELA 18 – Estudo do eluente mais adequado para a dessorção, em 10 mL, das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em vazão de 1 $mL.min^{-1}$..... 43
TABELA 19 - Recuperação das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V), As(V)) na etapa de "clean up" antes e após a esterilização em solução aquosa. 47
TABELA 20 – Recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em solução esterilizada e não esterilizada após a separação cromatográfica. 48
TABELA 21 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Glicina após a etapa de "clean up". 49
TABELA 22 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Serina após a etapa de "clean up". 50
TABELA 23 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Metionina após a etapa de "clean up". 51
TABELA 24 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Ácido Aspártico após a etapa de "clean up"..... 52
TABELA 25 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Ácido Aspártico após a etapa de "clean up"..... 53
TABELA 26 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Glicose após a etapa de "clean up". 54
TABELA 27 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Ácido Ascórbico após a etapa de "clean up"..... 55
TABELA 28 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Cianocobalamina após a etapa de "clean up"..... 56
TABELA 29 – Estudo da interferência da matriz (glicose 0,1%) na recuperação do As (III) no efluente da etapa de "clean up". 57
TABELA 30 - Estudo da interferência da matriz (glicose 0,1%) na eluíção das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) na etapa de "clean up"..... 57
TABELA 31 - Recuperação de 50 $\mu g.L^{-1}$ de As(III) no efluente da etapa de "clean up". 58
TABELA 32 - Recuperação de 50 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécie de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) eluídas com 10, 20 e 30 mL de $(NH_4)H_2PO_4$ na etapa de "clean up"..... 59
TABELA 33 – Recuperação de 50 $\mu g.L^{-1}$ das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Citoneurin, separadas no sistema cromatográfico. 59
TABELA 34 – Recuperação de 50 $\mu g.L^{-1}$ das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Nefroamino AEH, separadas no sistema cromatográfico. 60

TABELA 35 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Aminosteril HEPA 8%, separadas no sistema cromatográfico. 60
TABELA 36 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Frutovena, são separadas no sistema cromatográfico. 61
TABELA 37 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Aminoped 10%, separadas no sistema cromatográfico..... 61
TABELA 38 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), solução de Aminoplasmal L 10 A, separadas no sistema cromatográfico. 62
TABELA 39 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)),em solução de Ácido Ascórbico, separadas no sistema cromatográfico..... 62
TABELA 40 - Concentração total de As nas amostras comerciais 63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplo de uma resina trocadora de cátions. 18
FIGURA 2: Exemplo de uma resina trocadora de ânions. 18
FIGURA 3: Aparelho de HG-AAS. 24
FIGURA 4: Sistema de HPLC usado para a separação das espécies de arsênios. 25
FIGURA 5: Sistema de "clean up" 26
FIGURA 6: Cromatograma das frações de coletadas a cada minuto das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em fase móvel de 10 mM de $(NH_4)H_2PO_4$ em pH 9,0 e vazão de 1 mL. min^{-1}. (A) Injeção das quatro espécies de As separadamente. (B) Injeção de uma solução contendo todas as espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V), As(V)). 35
FIGURA 7: Cromatograma das espécies de As em solução de 2 M de HCl.Concentração de cada espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 44
FIGURA 8: Cromatograma das espécies de As em solução de 5M de NH_4Cl. Concentração de cada espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 45
FIGURA 9: Cromatograma das espécies de As em solução de 0,2M de NH_4Cl. Concentração de cada espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 45
FIGURA 10: Cromatograma do MMA(V) em solução de 50 mM de NH_4Cl. Concentração da espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 45
FIGURA 11: Cromatograma do MMA(V) em solução de 50 mM de $NH_4H_2PO_4$. Concentração da espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 46
FIGURA 12: Cromatograma das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V))em solução de 10 mM de $NH_4H_2PO_4$ .Concentração de cada espécie de As 100 $\mu g.L^{-1}$. 46
FIGURA 13: Cromatograma das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em solução aquosa antes e após a esterilização com estapa de "clean up". Concentração das espécies 160 $\mu g.L^{-1}$, volume de injeção de 500 µL, eluente 10 mM $NH_4H_2PO_4$ em pH 6,0. 48
FIGURA 14. Cromatograma das espécies de As (80 $\mu g.L^{-1}$) em solução de 0,1% de Glicina antes e após a esterilização 49
FIGURA 15: Cromatograma das espécies de As (80 $\mu g.L^{-1}$) em solução de 0,1% de Serina antes e após a esterilização 50
FIGURA 16: Cromatograma das espécies de As (80 $\mu g.L^{-1}$) em solução de 0,1% de Metionina antes e após a esterilização 51

FIGURA 17: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Ácido Aspártico antes e após a esterilização 52
FIGURA 18: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Fenilalanina antes e após a esterilização 53
FIGURA 19: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Glicose antes e após a esterilização 54
FIGURA 20: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Ácido Ascórbico antes e após a esterilização 55
FIGURA 21: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Cianocobalamina antes e após a esterilização 56
FIGURA 22: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Citoneurin 59
FIGURA 23: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Nefroamino AEH. 60
FIGURA 24: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminosteril HEPA 8% 60
FIGURA 25: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Frutovena. 61
FIGURA 26: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminoped 10%. 61
FIGURA 27: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminoplasmal L 10 A. 62
FIGURA 28: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Ácido Ascórbico. 62

LISTA DE ABREVIATURAS

PN (Nutrition Parenteral) – Nutrição Parenteral

USP (United States Pharmacpopeia) – Farmacopéia Americana

BP (British Pharmacopeia) – Farmacopéia Britânica

NP – Não Parenteral

PVC – Cloreto de Polivinila

WHO (World Health Oraganization) - Organização Mundiala de Saúde

AsB – Arsenobetaína

AsC – Arsenocolina

MMA(III) – Monometilarsênico

MMA(V) – Monometilarsonôso

DMA(III) – Dimetilarsênico

DMA(V) – Dimetilarsínico

TMAO (Trimethilarsenic oxide) – Óxido Trimetilarsênio

TMA^+ (Tetramethilarsonious ion) – Íon tetrametilarsônico)

HPLC (Hight Performance Liquid Chromatography) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICP-MS (Inductivel Coupled Plasma Mass Spectrometry) – Plasma Indutivamente Acoplado com Espectrômetro de Massa

ICP-AES (Inductivel Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) – Plasma Indutivamente Acoplado com Espectrometria de Emissão Atômica

FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

ETAAS (Electrothermical Atomic Absorption Spectrometry) – Espectrometria de Absorção Atômica com Aquecimento Eletrotérmico

HGAAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry) - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS v
ABSTRACT ix
LISTA DE TABELAS xi
LISTA DE FIGURAS xiv
LISTA DE ABREVIATURAS xvi
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Solução de Nutrição Parenteral 2
1.1.1 Classificação das soluções de Nutrição Parenteral 3
1.2 Embalagens utilizadas em Nutrição Parenteral 3
1.2.1 Embalagens de vidro 4
1.3 Procedimento de Esterilização das Soluções Parenterais 7
1.4 Arsênio 9
1.5 Função dos óxidos de As na formação do vidro 12
1.6 Toxicologia 14
1.7 Metilação 15
1.8 Especiação 16
1.9 Contaminação das soluções de nutrição parenteral por arsênio 19
2 MATERIAL E MÉTODOS 22
2.1 Instrumentação 22
2.2 Reagentes e Soluções 23
2.3 Controle da Contaminação 23
2.4 Desenvolvimento das condições de especiação 24
2.4.1 Escolha das condições para a determinação das espécies de arsênio por HGAAS. 24
2.4.2 Escolha das condições cromatográfica. 25
2.5 Escolha das condições para a etapa de "Clean up" 26
2.6 Investigação sobre formação de As orgânico após o processo de esterilização de soluções de aninácidos, glicose e vitaminas. 28
2.7 Ensaios de Recuperação das espécies de As nas amostras comerciais 29
2.8 Determinação das espécies de As nas soluções comerciais 29
3 RESULTADO E DISCUSSÃO 31
3.1 Desenvolvimento das condições de especiação 31
3.2. Escolha das condições para a determinação das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) por HGAAS 31
3.3 Escolha das condições cromatográfica. 34
3.5 Escolha das condições para a etapa de "Clean up" 40
3.5.1. Efeito do pH na retenção das espécies de As 41
3.5.2. Efeito da vazão na retenção do As(III) 42

3.6 Investigação sobre formação de As orgânico no processo de esterilização de soluções de aminoácidos, glicose e vitaminas. 47
3.7 Ensaios de Recuperação das espécies de As nas amostras comerciais 58
3.7 Determinação das espécies de As nas soluções comerciais..... 63
4 CONCLUSÃO..... 64
5 APÊNDICES 65
5.1 Apêndice 1 - Reagentes utilizados..... 65
5.2 Apêndice 2 – Condições utilizadas na etapa de "clean up"..... 66
5.3 Apendice 3 – Condições utilizadas para Cromatogragia Líquida de Alta Eficiência 67
5.4 Apendice 4 – Condições utilizadas na Espectrometria de Absorção Atômica - Geração de Hidretos 68
6 BIBLIGRAFIA..... 70

1 INTRODUÇÃO

A toxicidade do arsênio não depende somente da sua concentração total, mas também de suas formas químicas. Das espécies inorgânicas de arsênio, a arsina é a espécie mais tóxica enquanto que o arsenito é aceito como sendo mais tóxico que arseniato [1].

O arsênio inorgânico é reduzido no sangue de As(V) a As(III), metilados oxidativamente a ácido monometil arsênico (MMA) e em seguida à ácido dimetil arsênico (DMA). Assim, a metilação é reconhecida como um mecanismo de detoxicação. Porém há relatado que MMA e DMA podem ser mutagênicos, citogênicos e carcinogênicos tanto quanto ou mais que os arsênios inorgânicos [2].

O arsênio pode entrar no meio ambiente como arsênio inorgânico através de pesticidas usados na agricultura ou através de processos industriais, como na produção de ligas e vidros [1].

O trióxido de arsênio é utilizado na produção de vidros para evitar a formação de bolhas e, assim, garantir a sua transparência, sendo que esta é uma propriedade indispensável em embalagens para medicamentos que requerem inspeção visual imediatamente antes do uso [3].

No processo de fusão do vidro, o trióxido é convertido a pentóxido, de tal forma que a espécie predominante no produto final é o As(V).

Muitos dos medicamentos armazenados em embalagens de vidro possuem propriedades redutoras, como algumas vitaminas, carboidratos e aminoácidos, ou ainda, agentes redutores são adicionados para garantir a estabilidade das formulações.

Em estudos anteriores, comprovou-se que o arsênio pode ser extraído por infusões armazenadas em embalagens de vidro [4].

Neste trabalho, através de um estudo de especiação, por cromatografia líquida de troca de íons com coleta de frações e determinação por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, observou-se a possibilidade do As(V) ser reduzido pela interação com substâncias redutoras comumente utilizadas em formulações medicamentosas. Ainda estudou-se a possibilidade de substâncias orgânicas promoverem a metilação das espécies de arsênio inorgânico, convertendo-as assim nas respectivas espécies orgânicas (DMA e MMA).

Além disso, averiguou-se se a conversão ocorreria ou seria acelerada durante o processo térmico para a esterilização do produto envasado.

1.1 Solução de Nutrição Parenteral

A Nutrição Parenteral (PN) consiste na administração de todos os nutrientes necessários, via intravenosa, a indivíduos que não podem consumir nutrientes via trato gastrointestinal. O conceito nutrição parenteral foi proposto por Dudrick em 1968 [5].

Este tipo de nutrição pode ser realizado de forma total ou parcial. PN parcial se aplica a indivíduos capazes de se manter parcialmente por via oral, mas que necessitam de alguma assistência e apoio através de outros meios. É prescrita a pacientes portadores de diversas doenças complexas como câncer ou AIDS, para pacientes cirúrgicos, pré e pós-operatório, e pacientes pediátricos [6].

Quando os indivíduos são completamente incapazes de comer normalmente e não podem se manter sob o ponto de vista nutricional, torna-se necessária a nutrição parenteral total como modalidade terapêutica primária. É aplicada ao tratamento de pacientes com fístulas enterocutâneas, enteropatia inflamatória, pacientes com insuficiência renal aguda e crônica, insuficiência cardíaca e insuficiência hepática.

As soluções usadas na nutrição parenteral são formuladas para:

- Garantir um nível calórico suficiente e um bom balanço entre calorias e nitrogênio;
- Suprir água, eletrólitos e carboidratos necessários ao corpo;
- Atuar como veículo para infusão de medicamentos que são compatíveis com a solução;
- Agir como expansores do plasma;
- Promover diurese quando o corpo está retendo fluidos;
- Agir como agente dialisante em pacientes com função renal enfraquecida.

A composição básica do preparo parenteral é relativamente padronizada. As misturas contêm três categorias de nutrientes: proteínas, na forma de aminoácidos; açúcares, como a glicose; e lipídeos. São produzidas como soluções aquosas, hidrolisados protéicos e ainda como emulsões. Para manter um metabolismo celular normal, as soluções devem conter sais minerais, como eletrólitos, vitaminas e elementos traço. Os elementos traço considerados essenciais para o metabolismo humano normal incluem cobalto, cromo, cobre, iodo, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco.

As formulações parenterais têm sido objeto de numerosos estudos, visando o melhoramento da esterilidade, apirogenicidade, o monitoramento de contaminações, a

normalização da composição e estabilidade, pois, apesar de todos os cuidados, as técnicas envolvidas não são totalmente isentas de riscos, existindo tanto o risco de contaminação microbiológica, no momento da administração, como também contaminação química, como é o caso da contaminação por elementos como alumínio, níquel, cromo, germânio, chumbo e arsênio, entre outros [7-10].

1.1.1 Classificação das soluções de Nutrição Parenteral

As formulações parenterais são classificadas em soluções parenterais de grande volume e soluções parenterais de pequeno volume. A designação solução parenteral de grande volume, segundo a farmacopéia americana (USP), é aplicada a soluções para uso intravenoso, embaladas em recipientes com 100 mL ou mais de capacidade. As formulações de grande volume incluem soluções de aminoácidos, emulsões lipídicas e soluções para o suporte renal, hepático e para recém nascidos.

Soluções salinas como de cloretos de sódio (0,9 e 10%) ou potássio (7,5 e 10%), assim como de glicose (10 e 50%) são alguns exemplos de soluções de pequeno volume, as quais são armazenadas em embalagens com até 100 mL de capacidade. Nesta classificação também estão outros eletrólitos como os cloretos de cálcio e magnésio, bicarbonato de sódio e vitaminas, em concentrações que variam de acordo com as necessidades de cada paciente.

A administração intravenosa fornece uma rota de dispersão rápida de grandes quantidades de fluidos e medicamentos a todas as partes do corpo, alcançando um efeito terapêutico rápido. A velocidade de infusão deve ser controlada para estabelecer e manter os níveis desejados [11].

1.2 Embalagens utilizadas em Nutrição Parenteral

Basicamente, existem dois tipos de embalagens utilizadas para armazenar soluções de nutrição parenteral: embalagens plásticas e embalagens de vidro.

As embalagens plásticas tornaram-se comercialmente disponíveis somente na década de 80. Ao contrário do vidro, que é um produto inorgânico, o plástico é de natureza orgânica e polimérica. Os plásticos mais importantes para embalagens de soluções parenterais são as poliolefinas (polipropileno, polietileno e copolímeros de etileno e polipropileno) e o cloreto de polivinila (PVC).

1.2.1 Embalagens de vidro

Os vidros são mais utilizados como embalagens pelas indústrias farmacêuticas, em virtude de sua estrutura rígida, sua alta resistência química, facilidade de esterilização e transparência.

Recipientes de vidro são muito utilizados para o armazenamento de medicamentos. O uso de embalagens de vidro na indústria de soluções parenterais se deve, principalmente, às seguintes características:

- possuem excelente resistência química na interação com o conteúdo, não absorvendo nem liberando componentes orgânicos;
- o vidro é impermeável a entrada ou saída de gases;
- são facilmente limpas, por causa de sua superfície lisa;
- são transparentes, facilitando a inspeção do conteúdo;
- são rígidas, fortes e dimensionalmente estáveis, suportam vácuos e podem ser aquecidas a 121°C para esterilização a vapor, ou a 260°C para esterilização seca, sem deformação;
- podem ser facilmente confeccionadas a partir de um molde.

No vidro existem vários constituintes que podem ser divididos em cinco categorias, tomando-se por base a função que desempenham no processo: formador, fundente, agente modificador, agente de cor e agente de refino [12].

Os formadores de vidro são os responsáveis pela formação da rede tridimensional estendida aleatória; os principais formadores comerciais são: SiO_2 (sílica), B_2O_3 e P_2O_5.

Os fundentes têm a função de reduzir a temperatura de processamento para valores inferiores a 1600 °C, sendo os mais comuns os óxidos de metais alcalinos (lítio, sódio e potássio) e o PbO.

A degradação das propriedades é usualmente controlada pela adição de agentes modificadores, os quais incluem os óxidos de metais de transição e de terras-raras e, principalmente, a alumina (Al_2O_3).

Os agentes de refino são adicionados para promover a remoção de bolhas geradas no fundido, sendo utilizados em quantidades muito pequenas (<1%mol). Incluem-se aí os óxidos de antimônio e arsênio (As_2O_3), KNO_3, $NaNO_3$, NaCl, CaF_2, NaF, Na_3AlF_3 e alguns sulfatos.

Os agentes de cor, como o próprio nome sugere, são utilizados para conferir cor aos vidros. Os vidros coloridos são, usualmente, produzidos pela adição de compostos de metais

de transição 3d ou de terras raras 4f. Contudo, a cor final obtida depende do estado de oxidação do metal, da sua concentração, da composição do vidro e do tratamento térmico ao qual foi submetido.

Uma característica importante do vidro para uso farmacêutico é a resistência ao ataque químico, ou a durabilidade química. Esta durabilidade, também denominada estabilidade química, é expressa pela resistência hidrolítica, isto é, a resistência em liberar substâncias minerais solúveis para a água, quando em contato com a superfície interna do recipiente. A resistência hidrolítica é calculada pela titulação da alcalinidade [11, 13].

As farmacopéias Americana e Britânica desenvolveram uma especificação para classificação dos vidros, de acordo com a resistência hidrolítica [13,14]:

Tipo I: vidros borosilicatos, com elevada resistência hidrolítica, devido à sua composição química. Possuem uma quantidade relativamente baixa de Na_2O e uma quantidade relativamente alta de B_2O_3 e Al_2O_3, responsáveis pela durabilidade química superior. A função mais importante do B_2O_3 é agir como um fundente não alcalino, facilitando a fusão do vidro pobre em Na_2O. Na forma de tubos, são usados na fabricação de vials, ampolas, corpo das seringas e componentes para a administração de grandes volumes parenterais. As soluções de pequeno volume geralmente estão disponíveis em seringas ou cartuchos de vidro de dose única. Estes vidros são apropriados não só para uso parenteral, como também para sangue humano e seus componentes.

Tipo II: vidros sódio-cálcicos tratados. O processo usado para dealcalinizar a superfície é conhecido como tratamento sulfúrico e é feito para melhorar a resistência química. Tipicamente, dióxido de enxofre é introduzido nos frascos recém formados, passando na máquina da forma para o recozimento. O SO_2 reage com a superfície do vidro para formar sulfato de sódio. Frascos frios podem ser tratados pela introdução de enxofre ou um composto de enxofre, tais como ácido sulfúrico ou sulfato de amônio e reaquecidos dentro da faixa de temperatura de recozimento, em torno de 550^0 C ou mais. Com o tratamento com SO_2, a reação global que ocorre é a seguinte:

$$SO_2 + ½\ O_2 + Na_2O\ (\text{do vidro}) \rightarrow Na_2SO_4 \qquad (1)$$

Íons hidrogênio, provavelmente oriundos da umidade ambiente, têm um papel importante. Primeiro, ocorre a formação de ácido sulfúrico na superfície do vidro, seguida pela troca de íons hidrogênio com íons sódio do vidro.

$$SO_2 + ½\ O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4 \quad (2)$$

$$H_2SO_4 + Na_{(vidro)} \rightarrow Na_2SO_4 + H_{(vidro)} \quad (3)$$

O produto final é a troca iônica e difusão dos íons H^+ dentro do vidro. A intensidade de dealcalinização é indicada pela quantidade de sulfato de sódio produzido na superfície do vidro. Tipicamente, a quantidade de sódio no depósito de sulfato é igual aquela na superfície do vidro, de alguns décimos de micrômetro de espessura. Os frascos são comercializados com uma "névoa" de sulfato de sódio presente. A névoa é retirada quando eles são lavados antes do envase, aumentando a eficiência da limpeza. Este processo não somente reduz a abundância de íons sódio disponíveis na superfície para a reação com o produto líquido, mas também a estabilidade da superfície alterada é grandemente aumentada, e a extração de todos os componentes do vidro pelo conteúdo do frasco é reduzido.

A dealcalinização pode também ser feita com outros gases ácidos. O gás clorídrico, por exemplo, conduz a formação de cloreto de sódio em vez de sulfato de sódio. Em geral, vidros Tipo II não são comumente usados para armazenar soluções parenterais, mas para preparações aquosas para uso parenteral com pH menor que 7, sendo necessário verificar a estabilidade de cada preparação neste tipo de recipiente [11].

Tipo III: são vidros sódio-cálcicos não tratados. Possuem resistência hidrolítica moderada e são apropriados para soluções não aquosas e sólidos para uso parenteral e não parenteral, além de alimentos, vinhos, cervejas, água e cosméticos.

Tipo IV: são vidros sódio-cálcicos também denominados NP (Não Parenterais). Possuem baixa resistência hidrolítica e são utilizados para preparações sólidas, líquidas ou semi sólidas, que não são empregadas por via parenteral.

O teste de resistência hidrolítica é normatizado segundo as farmacopéias americana e britânica [5,6], onde o vidro é moído em pequenos fragmentos, peneirado, lavado e levado à autoclave com água ultrapura por 30 minutos. Depois de decantada, uma porção é titulada com ácido sulfúrico 0,02 N. Os vidros são classificados de acordo com o volume de ácido gasto na titulação (item 2.6). Vidros Tipo I, por exemplo, têm alta resistência e não devem consumir mais do que 1 mL de H_2SO_4 0,02 N. A Tabela 1 mostra a classificação dos tipos de vidro em função do teste.

Tabela 1: Classificação dos tipos de vidro de acordo com a resistência hidrolítica.

Tipo	Descrição do vidro	Tipo de teste	Limites	
			Capacidade do frasco* (mL)	mL H_2SO_4 0,02 N
I	Borosilicato, alta resistência	Vidro moído	Todos	1,0
II	Sodo-cálcico tratado	Ataque da água**	100 mL ou menos	0,7
			Acima de 100 mL	0,2
III	Sodo-cálcico	Vidro moído	Todos	8,5
NP	Sodo-cálcicos	Vidro moído	Todos	15,0

*Capacidade se refere ao volume que o frasco contém;
**O teste do ataque da água ocorre somente com água dentro do frasco e com 60 min de autoclavagem.

De acordo com as farmacopéias americana e britânica, o As também deve ser investigado no processo de extração dos componentes durante a autoclavagem. O As é determinado pela conversão do elemento à arsina e reação com dietilditiocarbamato de prata para formar um complexo vermelho. A redução do As ocorre com zinco metálico em meio ácido. A determinação é feita por colorimetria. O procedimento se aplica aos recipientes de vidro que armazenam soluções parenterais, para o limite de arsênio extraível (extração pela autoclavagem do recipiente envasado apenas com água pura), o qual não deve ultrapassar 0,1 ppm [13,14].

1.3 Procedimento de Esterilização das Soluções Parenterais

Para produzir um medicamento estéril, os fabricantes devem levar em consideração uma série de fatores, sistemas e técnicas.

Esterilidade é definida como ausência completa de microorganismos. O processo de esterilização, contudo, pode ser definido probabilisticamente, devido à ordem logarítmica da destruição microbiológica e à ausência de métodos absolutos para confirmação de esterilidade [11]. Visto que a determinação de esterilidade é vulnerável a erros e limitações nos sistemas usados para controle, esterilidade é melhor definida como a ausência total de microorganismos, dentro de limites especificados de probabilidade.

A confiança da esterilidade de qualquer produto, material ou substância é dependente do método de esterilização utilizado. Os métodos de esterilização mais utilizados são o calor úmido, o calor seco, a irradiação ou o uso de agentes químicos como, por exemplo, o óxido de

etileno, o formaldeído e o peróxido de hidrogênio. Entretanto, deve-se considerar que cada processo de esterilização tem suas limitações específicas. Não existe um método universal que possa ser aplicado a todos os produtos, materiais e substâncias. Os fatores determinantes na escolha do método apropriado são: (a) sua compatibilidade com o produto, material ou substância a ser esterilizada; (b) a resistência da embalagem; (c) a penetração do agente em áreas remotas, que podem conter microorganismos; (d) um alto nível de atividade letal, resultando na necessidade de pequenas quantidades do agente esterilizante; (e) baixo custo; (f) alto grau de segurança e baixa toxicidade do homem; (g) simplicidade; (h) tempo requerido para o processo e (i) sua adaptabilidade para processos em linha.

O calor úmido pode ser classificado como um agente físico de esterilização. O vapor saturado tem um alto nível de atividade letal, com a destruição de todos os tipos de microorganismos, incluindo esporos altamente resistentes, num período de tempo de 15 minutos, a 121^0C. Seu custo é relativamente baixo, comparado aos outros agentes esterilizantes. As vantagens da esterilização com vapor saturado são a simplicidade, por requerer apenas monitoramento de tempo, temperatura e pressão, e a velocidade. Uma das maiores desvantagens é sua incompatibilidade com muitos materiais sensíveis ao calor.

O vapor saturado tem sido usado para esterilização de numerosos materiais, incluindo recipientes para soluções parenterais aquosas ou meios bacteriológicos, luvas cirúrgicas, tanques de fermentação, materiais de vidro e instrumentos e utensílios de aço inoxidável. A esterilização é feita em batelada, em uma autoclave.

O calor seco é geralmente aplicado a materiais tolerantes ao calor, por exemplo, metais, vidros, gorduras e óleos. O calor seco tem sido usado para destruir não somente microorganismos, mas também pirogênios. É considerado um dos métodos de esterilização mais seguros. A temperatura e tempo típicos são 160^0C e 60 minutos. O método é relativamente simples, porém é essencial que haja uma boa circulação do calor sobre o produto a ser esterilizado. Estudos com relação à resistência de alguns esporos mostram ser necessários um tempo de até três horas para garantir a sua esterilidade [11].

A radiação gama, proveniente da aceleração de elétrons e do ^{60}Co, é outro método de esterilização utilizado. Este método tem excelente atividade letal e alto nível de penetração na maioria dos materiais, sendo esta dependente da fonte de energia e do tipo de material. A esterilização por radiação não é um método universalmente aceito, mas tem sido aplicado mais em alimentos, itens médicos, seringas plásticas e cosméticos. Raramente é utilizado para

medicamentos, devido aos danos que pode causar ao produto como, por exemplo, rompimento das ligações químicas e ainda devido ao alto custo inicial, bem como segurança no processo.

O agente químico mais utilizado para esterilização é o óxido de etileno. É altamente reativo, alquilante, tóxico, inflamável e explosivo e é empregado para esterilizar, principalmente, materiais médicos. A destruição dos microorganismos é diretamente dependente da umidade, concentração de gás, temperatura e tempo de exposição.

O método comumente usado para esterilização de soluções parenterais armazenadas tanto em recipientes de vidro, como em embalagens plásticas, é a esterilização por calor úmido (vapor saturado) [11].

1.4 Arsênio

O arsênio não é muito abundante, é um elemento que está presente em uma média de concentração na crosta terrestre de 20 $mg.kg^{-1}$ e em águas naturais na faixa de 0,2 a 40 $ng.mL^{-1}$ [15, 2].

Suas principais fontes são os sulfetos, que ocorrem em pequenas quantidades combinados com outros minérios. São, contudo bastante comuns porque são obtidos como subprodutos da calcinação de minérios da classe dos sulfetos em altos-fornos [15].

O arsênio pode ser obtido na forma de As_2O_3, a partir das poeiras de exaustão liberadas na calcinação de CuS, PbS, FeS, CoS, e NiS na presença de ar. O óxido pode ser reduzido a As° com carbono. Os únicos minérios comuns de arsênio são as arsenopiritas, FeAsS (cor branca acinzentada com brilho metálico), realgar, As_4S_4 (coloração vermelho alaranjada) e orpimento, As_2S_3 (cor amarela). Os dois últimos são encontrados em áreas vulcânicas. O elemento As é obtido industrialmente, aquecendo-se arsenetos tais como NiAs, $NiAs_2$, $FeAs_2$, ou arsenopiritas, FeAsS, à cerca de 700 °C na ausência de ar.

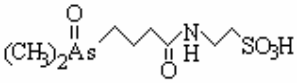
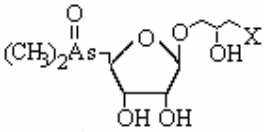
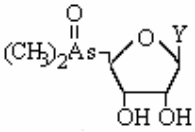
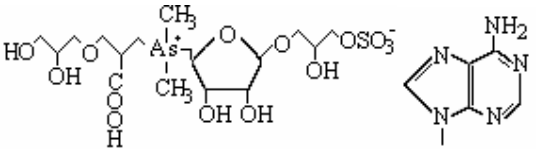
Há poucos usos para o As metálico; mas é empregado em ligas de chumbo, para torná-lo mais duro. Pequenas quantidades são usadas para dopar semicondutores e para fabricar diodos emissores de luz (LED). Geralmente, os compostos de arsênio são preparados a partir do As_2O_3. São utilizados principalmente como pesticidas, em medicina no combate à parasitas, em preservativos de madeira devido à natureza tóxica desses compostos [15, 2].

O Arsênio ([Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^3$) pertence ao grupo 15 no sistema periódico, assim, possuindo cinco elétrons na camada de valência, podendo ser encontrado em vários estados de

oxidação –III, 0, +III e +V. Os estados de oxidação mais comuns são +III e +V. Este elemento pode se apresentar como compostos inorgânicos e orgânicos, tais como mostra a Tabela 2. [15, 16]

Tabela 2 – Estrutura dos compostos de Arsênio.

As -III	As +III	As +V
	Inorgânico	
H—As— H | H	HO—As— OH | O H	H O | OH—As = O | O H
Arsina	Arsenito	Arsenato
	Orgânicos	
H —As— CH_3 | H	HO—As— CH_3 | O H	H O | H_3C—As = O | O H
Metilarsina	MMA	MMA
H_3C—As—CH_3 | H	H_3C —As— CH_3 | O H	H O | H_3C—As = O | CH_3
Dimetilarsina	DMA	DMA
H_3C —As— CH_3 | CH_3		CH_3 | H_3C —As = O | CH_3
Trimetilarsina		TMAO

As -III	As +III	As +V
		$H_3C-As^{+}(CH_3)_2-CH_3$ $TeMA^{+}$
		$H_3C-As^{+}(CH_3)_2-CH_2COO^{-}$ Arsenobetaína
		$H_3C-As^{+}(CH_3)_2-CH_2CH_2OH$ Arsenocolina
	Arsenoaçúcares	
		
		 X= SO3H, OH, OSO3H, OPO(OH)OCH2CHRCH2R R= OH, OOC(CH2)nCH3
		 Y= OCH3, OCH2(CHOH)4CH2OHOCH2CH(OH)COOH, OC(O)NHCH2COOH
		

1.5 Função dos óxidos de As na formação do vidro

O arsênio pode estar presente no vidro na forma de óxidos, em quantidades que variam de 0,1 a 1% da massa total constituinte do vidro. O trióxido de arsênio e antimônio são normalmente adicionados como agentes terminadores ou finalizadores, para a remoção das inclusões gasosas, ou bolhas, que são ou possam vir a ser formadas no processamento do vidro, sendo o pentóxido de arsênio também usado sob certas circunstâncias.

Bolhas são formadas pelos gases desprendidos durante o início da fusão ou, ainda, na decomposição dos componentes da matéria prima que compõe o vidro. Estas etapas podem produzir grandes quantidades de CO_2, SO_3, NO_x e H_2O [16]. Reações envolvendo metais podem gerar oxigênio, dióxido de carbono ou ainda hidrogênio por reações catalíticas. Apesar da presença de bolhas em amostras de vidro não ser necessariamente um problema para muitos estudos científicos, é definitivamente indesejável do ponto de vista comercial, pois quase sempre esses produtos são considerados defeituosos e resultam na sua rejeição. A remoção dessas pequenas inclusões gasosas, por métodos químicos começa durante o processo de fundição e se estende após completo desaparecimento dos resíduos. O mecanismo de atuação dos agentes terminadores ainda são controversos, porém não há nenhum questionamento quanto à eficácia de seu uso, principalmente quando combinados com nitratos alcalinos. Eles atuam formando grandes bolhas, que rapidamente emergem à superfície, carreando bolhas menores. Uma possível seqüência de eventos pode ser descrita. Durante a fusão, o óxido de As (III) reage com nitrato para liberar óxidos de nitrogênio e oxigênio, como na reação 4:

$$4\ KNO_3 + 2\ As_2O_3 \rightarrow 2\ K_2O + 2\ As_2O_5 + 4\ NO^{\uparrow} + O_2^{\uparrow} \qquad (4)$$

Após decomposição completa da matéria prima, a massa é usualmente aquecida a temperaturas maiores. Visto que o trióxido é mais estável que o pentóxido à altas temperaturas, o pentóxido produzido via reação com nitrato pode se decompor, segundo a reação 5:

$$As_2O_5 \rightarrow As_2O_3 + O_2^{\uparrow} \qquad (5)$$

Esta reação produz bolhas de O_2, que podem formar novas bolhas ou difundir em bolhas menores aumentando, deste modo, seu tamanho e razão de evolução [16, 17].

Estudos mostram que a solubilidade física dos gases na fundição do vidro é de grande importância no refinamento e acabamento da fusão. Esta interação resulta na fugacidade dos gases dissolvidos fisicamente, os quais podem interagir com a atmosfera do forno ou com bolhas. Como exemplo, a equação redox para o arsênio mostra a reação entre o oxigênio quimicamente dissolvido em complexo arsenato e o oxigênio dissolvido fisicamente no meio (reação 6) [18]:

$$As^{5+} + O^{2-} \leftrightarrow As^{3+} + ½\ O_2 \tag{6}$$

Outra maneira de representar o mecanismo de atuação do arsênio na remoção das bolhas é através da reação 7 [19]:

$$As_2O_5\ (\text{vidro}) \leftrightarrow As_2O_3\ (\text{vidro}) + O_2 \tag{7}$$

O equilíbrio é deslocado para o lado direito da equação à altas temperaturas, e o gás oxigênio é expulso quando o vidro é super saturado por oxigênio. A liberação do oxigênio ocorre pela dispersão de minúsculas bolhas que crescem e sobem a superfície. Quando a temperatura é diminuída, o equilíbrio favorece ao As_2O_5 (vidro) e o oxigênio é reabsorvido pelo meio.

O arsênio se liga na estrutura do vidro, ou silicato, de diversas maneiras dependendo do óxido de arsênio adicionado. O trióxido de arsênio, comumente representado como As_4O_6, possui estrutura tetraédrica, semelhante ao Si, podendo então substituir o Si na rede vítrea e atuar como formador de rede [17, 20]. A estrutura do pentóxido de arsênio consiste de cadeias espiraladas, formadas de tetraedros de AsO_4 e octaedros de AsO_6 intercalados [21]. Como a inclusão na rede vítrea somente ocorre quando o óxido existe com coordenação tetraédrica, os tetraedros de AsO_4 podem ser incorporados à rede e os octaedros AsO_6 apenas após a sua conversão à forma tetraédrica.

1.6 Toxicologia

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estipula como limite de máximo de ingestão diária 2µg de As por kg de massa corpórea. Os organismos marinhos são considerados os maiores bioacumuladores de As dada à tendência deste elemento em ser trocado por nitrogênio e fósforo em vários compostos, produzindo arsenobetaína, arsenocolina e arsenoaçúcares [22].

O consumo diário pode chegar de 0,01 a 0,3 mg de As dependendo da dieta. A concentração média de As em organismos humanos e fluídos corporais normais é de 0,02 a 0,06 µg g^{-1}. Em indivíduos normais, ou seja, sem exposição tóxica crônica ou aguda ao As a concentração presente no sangue é de cerca de 0,004 µg g^{-1}. No cabelo,as quantidades são geralmente maiores que 0,4 µg g^{-1}, sendo difícil, porém distinguir entre arsênio incorporado e depositado [23, 24].

A exposição humana se dá normalmente ao arsênio inorgânico, principalmente ao arsenato, em águas. Os arsênios orgânicos são encontrados mais comumente em alimentos, particularmente em frutos do mar e em outros animais marinhos e em plantas. As formas orgânicas de arsênio presentes em peixes e frutos do mar, arsenobetaína sendo o mais predominante, existindo também os arsenoaçúcares, são absorvidos e rapidamente excretados e se acredita que estes não são tóxicos [26].

A toxicidade aguda requer um pronto atendimento médico, geralmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados. As primeiras manifestações do envenenamento incluem: queimadura e secura da garganta e boca, displasia, cólica, vômito, diarréia e hemorragia. Paralisia muscular, edema facial e anomalias cardíacas, choque podendo ser desenvolvido rapidamente como resultado da desidratação [25].

A toxicidade subaguda envolve o sistema respiratório, gastrointestinal, cardiovascular, nervoso e hematopoético, causa perda de apetite, náusea e vômitos, secura da garganta, dores aguda, diarréia, fraqueza.

O longo tempo de exposição ao arsênio por água contaminada, pode levar a várias doenças como conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares distúrbios nos sistemas vascular periférico e nervoso, câncer de pele, gangrena e outros [25]. Os efeitos no útero e trato genitourinário e outras partes do corpo têm sido observados em estágios mais avançados da toxicidade do arsênio

A toxicidade do arsênio (V) está associada a sua estrutura e propriedades similares ao do fosfato, assim, o arsenato pode entrar em muitas reações bioquímicas no lugar do fosfato.

Como por exemplo, na bomba de sódio e no sistema de transporte de troca de ânions. Já o arsenito reage rapidamente, in vitro, com moléculas que possuem grupamentos tióis como a cisteína, podendo inibir as funções bioquímicas dessas moléculas [27].

O arsênio inorgânico é reduzido no sangue de As(V) a As(III) que é metilado oxidativamente a ácido monometil arsênico (MMA) e em seguida a ácido dimetil arsênico (DMA). Assim, a metilação tem sido conhecida como um mecanismo de desintoxicação. Mas estudos recentes têm relatado que MMA e DMA pode ser mutagênico, citogênico e carcinogênico tanto quanto ou mais que os arsênios inorgânicos. O fígado tem sido identificado como órgão principal da metilação do arsênio [2, 26].

1.7 Metilação

Arsênio inorgânico administrado é metabolizado *in vivo* por processos seqüenciais de reações de redução de arsênio pentavalente a trivalente envolvendo dois elétrons, seguido por metilações oxidativas a arsênios orgânicos pentavalentes (Equação 8) [27, 28].

A redução ocorre enzimaticamente na presença de tióis como a glutationa (GSH). O arsenato e MMA(V) redutases catalisam, em células de mamíferos, a redução do arsenato a arsenito e a do ácido monometilarsênico (MMA(V)) a ácido monometilarsônoso (MMA(III)).

A metilação do arsenito é catalizada por arsenito metiltransferase com *S*-adenosilmetionina (SAM) como um doador do grupo metil.

O primeiro passo de metilação forma MMA(V), uma forma de arsênio metilado pentavalente. MMA(V) é reduzido a MMA(III), e então, metilado produzindo DMA(V) na presença de MMA(III) metiltransferase.

Similarmente, a redução do DMA(V) a DMA(III), que posteriormente forma o óxido trimetil arsênio (TMAO), sendo o produto final do metabolismo do arsênio [27].

$$AsO(OH)_3 + 2\,e^- \rightarrow As(OH)_3 + CH_3^+ \rightarrow CH_3AsO(OH)_2 + 2\,e^- \rightarrow CH_3As(OH)_2 + CH_3^+ \rightarrow (CH_3)_2AsO(OH) + 2\,e^- \rightarrow (CH_3)_2AsOH + CH_3^+ \rightarrow (CH_3)_3AsO \quad (8)$$

1.8 Especiação

Especiação é a determinação da concentração das diferentes formas químicas de um elemento numa matriz, sendo que estas espécies juntas constituem a concentração total do elemento. As propriedades físicas, químicas e biológicas são dependentes da forma química em que ele está presente [29].

Uma variedade de técnicas tem sido usada para a especiação do As, como a Cromatografia a Gás e espectrofometria que, tem-se mostrado como técnicas efetivas para um ou mais tipos de As, mas nenhum foi usado para a mistura dos quatro tipos de As (As(III), DMA, MMA e As (V)) [30, 31].

Existem relatos de especiação de Arsênio por HPLC-ICP-MS (cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado), incluindo sistemas de separação como par-iônico, troca iônica e exclusão por tamanho. Estas técnicas são muito atrativas, mas por serem bastante caras não são largamente usadas.

A hifenação de HPLC com outras técnicas de detecção de espectrometria atômica, como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ETAAS) e espectrometria de emissão atômica de plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) são também usadas, contudo, não são sensíveis como ICP-MS.

A Absorção Atômica é a melhor escolha para a determinação de metais que formam hidretos voláteis, em conjunto com geração de hidretos [31]. De um modo geral, a técnica HGAAS (do inglês, Hydride Generation Atomic Absorption Spectometry) está baseada na reação de compostos de arsênio com tetraborato de sódio em meio ácido para produzir arsina. Arsenito (As(III)) e arsenato (As(V)) geram AsH_3, ácido monometilarsênico (MMA(V), $CH_3AsO(OH)_2$) gera CH_3AsH_2 e o ácido dimetilarsínico (DMA(V), $(CH3)_2AsO(OH)$ gera $(CH_3)_2AsH$. Contudo a formação dessas arsinas são dependentes do pH. O pH requerido nas reações de redução indica que as espécies de arsênio devem ser completamente protonadas, assim, elas podem ser reduzidas as arsinas correspondentes [32].

Após a formação dos respectivos hidretos, estes são conduzidos até um atomizador, normalmente um tubo de quartzo aquecido a 925° C.

A redução é efetuada como na reação 9 e 10 [33]:

$$(CH3)_nAsO(OH)_{3-n} + H^+ + BH_4^- \longrightarrow (CH3)_nAsO(OH)_{3-n} + H_2O + BH_3 \quad (9)$$

$$(CH3)_nAs(OH)_{3-n} + (3-n)H^+ + (3-n)BH_4^- \longrightarrow (CH)_nAsH_{3-n} + (3-n)H_2O + (3-n)BH_3 \quad (10)$$

Onde n é um número de 0 a 4.

Embora, a arsina possa ser gerada diretamente através do As (V), a reação é mais lenta que a do As (III). O efeito do estado de oxidação no sinal analítico pode decrescer ou ser eliminado pela aplicação de longos tempos de reação e altas concentrações de $NaBH_4$. De qualquer forma existem, ainda, diferenças consideráveis na sensibilidade obtidas, na geração de hidretos, entre as espécies de arsênios inorgânicos e orgânicos [32].

Para a especiação de arsênio inorgânico e arsênio orgânico, que estão predominantemente em águas, sedimentos e amostras biológicas, a pré-concentração e separação por meios clássicos de cromatografia de troca iônica podem ser feitas com resultados confiáveis. Assim, métodos como a combinação de separação por cromatografia e técnicas de pré-cocentração com detecção por absorção atômica tem sido bastante utilizado, pois promove altos fatores de enriquecimento e baixos limites de detecção por separar as espécies de interesse das matrizes complexas.

Alguns materiais inorgânicos como resinas trocadoras de íons, zeólitas, alumina tem sido usadas como materiais sorventes de íons em soluções aquosas [34].

Para o “clean up” dos quatro tipos de As, a solução é ajustada à pHs mais alcalinos onde há a ionização negativamente, assim podendo ser empregada resinas de troca aniônica [34].

Troca iônica é entendida como a troca de íons de mesmo sinal entre uma solução que entra em contato com um corpo sólido, que contém seus próprios íons [35].

Muitas substâncias naturais (como certas argilas) e artificiais têm propriedades de troca iônica, mas nos trabalhos analíticos que tem maior importância são os trocadores orgânicos sintéticos.

Os trocadores têm uma estrutura complexa e são na realidade polímeros. O polímero é portador de uma carga elétrica que é exatamente neutralizada por carga de contra íons. Estes íons são cátions de um trocador de cátions e ânions num trocador de ânions. Assim um trocador de cátions é constituído por um ânion polimérico e cátions ativos, enquanto que um trocador de ânions tem cátions poliméricos e anions ativos.

Uma resina trocadora de cátions muito usada é obtida através da copolimerização do estireno e divinilbenzeno seguida por uma sulfonação (Figura 1).

Os trocadores de ânions são também polímeros reticulados de alto peso molecular. A característica básica se deve a presença de grupos amino, amino substituído ou amônio quartenário. Os polímeros com amônio quartenárias são bases fortes; os com grupos amino ou amino subsituídos são considerados bases fracas. Uma resina que é largamente usada é preparada pela co-polimerização do estireno com divilbenzeno, seguida por uma clorometilação e a interação com uma base como a trimetilamina (Figura 2).

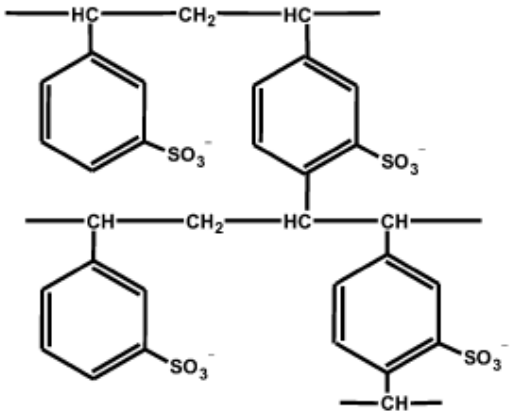


Figura 1: Exemplo de uma resina trocadora de cátions [31].

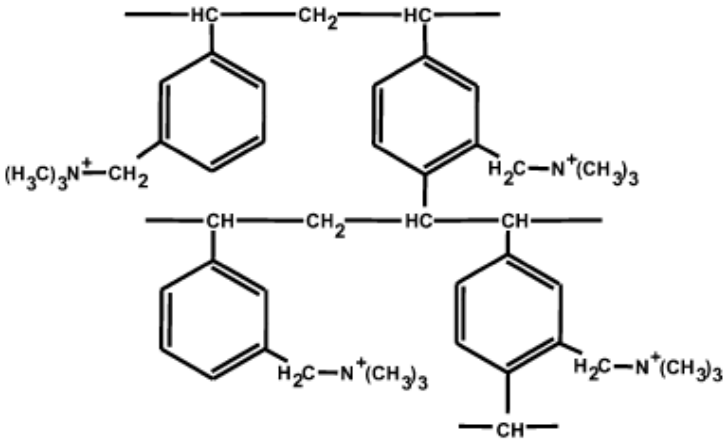


Figura 2: Exemplo de uma resina trocadora de ânions [31].

As exigências fundamentais para uma resina útil são:

- A resina deve ser suficientemente reticulada para que a sua solubilidade seja desprezível
- A resina deve ser suficientemente hidrofílica para permitir a difusão dos íons através da estrutura a uma velocidade finita
- A resina deve conter um número suficiente de grupos trocadores de íons acessíveis e deve ser quimicamente estável
- A resina inchada deve ser mais densa que a água

Cromatografia de troca de íons é usada para a separação de íons ou substâncias que são facilmente ionizadas. Ela utiliza mecanismo de equilíbrio de troca entre os ânions ou cátions que estão ligados covalentemente a uma resina (fase estacionária) e íons carregados opostamente na fase móvel que são atraídos por uma força eletrostática [36, 37].

A força iônica do soluto, o pH da fase móvel, a força iônica e a concentração do tampão, e a temperatura podem influenciar a separação e retenção dos analitos em HPLC de troca iônica [37].

A troca aniônica e catiônica tem sido usada para a especiação de arsênio. Troca aniônica separa arsenito (As(III)), arsenato (As(V)), ácido monometilarsônico (MMA(V)) e ácido dimetilarsínico (DMA(V)) com retenção mínima de arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), enquanto que a troca catiônica é do mesmo modo usada para separar AsC, AsB, óxido trimetilarsênico (TMAO) e íon tetrametilarsônio (Me_4As^+).

Sistemas de tampão comuns à cromatografia de troca iônica usado para separar compostos polares de As incluem fosfatos, carbonatos, ácidos ftálicos, hidróxido de tetrametil de amônio, entre outros.

Sistema isocrático e gradiente, ambos, são usados na cromatografia de troca de íons na separação de compostos de As, mas geralmente o sistema isocrático é mais usado.

1.9 Contaminação das soluções de nutrição parenteral por arsênio

Alguns estudos têm mostrado que soluções de nutrição parenteral podem ser contaminadas com metais pesados sendo os mais predominantes a presença de alumínio, arsênio, cromo, zinco, cobre, e estanho [4].

Bohrer et al mostrou que todos os produtos investigados tais como, soluções comercias de sais, glicose, emulsões lipídicas, formulações contendo aminoácidos e água para

injeção (mostrados na Tabela 3) apresentaram arsênio inorgânico como contaminante, mas somente em gluconato de cálcio, bicarbonato de sódio e em alguns preparados de vitaminas o limite total de arsênio excedeu o sugerido pela farmacopéia (0,1 $mg.L^{-1}$), sendo a embalagem de vidro a maior fonte desta contaminação, pois tanto o As(III) quanto o As(V) fazem parte da composição do vidro e podem ser lixiviados pela solução quando realizado o processo de esterilização [4, 38].

Tabela 3 – Espécies de arsênio como contaminante em soluções parenterais comerciais.

Produto	As(III) ($\mu g.L^{-1}$ ± RSD)	As(V) ($\mu g.L^{-1}$ ± RSD)	As Total ($\mu g.L^{-1}$)
Água para injeção[7]	2,9 ± 0,2	36,4 ± 3,7	39,3
Àgua para injeção[10]	3,4 ± 0,4	27,5 ± 1,2	30,9
KCl 19,1%[10]	n.d	41,3 ± 1,6	41,3
KCl 10%[4]	n.d	23,6 ± 0,8	23,6
NaCl 20%[10]	2,9 ± 0,2	40,9 ± 5,7	43,8
NaCl 20%[4]	n.d	15,9 ± 3,2	15,9
Acetado de sódio 2 meq/L[1]	4,3 ± 0,6	46,1 ± 2,0	46,1
Fosfato de sódio 0,5 mol/L[10]	n.d	36,7 ± 2,5	36,7
Bicarbonato de sódio 8,4%[5]	20,8 ± 2,0	227,8 ± 0,5	248,6
Bicarbonato de sódio 8,4%[9]	51,1 ± 0,8	147,2 ± 1,2	198,3
Gluconato de cálcio10%[11]	26,3 ± 2,3	46,8 ± 4,1	73,1
Gluconato de cálcio 10%[9]	19,9 ± 1,9	72,8 ± 0,5	92,7
Gluconato de cálcio 10%[4]	63,6 ± 2,0	176 ± 7,2	239,6
Sulfato de Magnésio 50%[11]	5,7 ± 0,2	15,7 ± 0,2	15,7
Sulfato de magnésio 50%[10]	21,3 ± 1,8	12,2 ± 1,2	33,5
Sulfato de magnésio 50%[9]	13,9 ± 3,0	39,9 ± 5,6	53,8
Glicose 25%[6]	5,3 ± 0,6	16,5 ± 2,6	21,8
Glicose 25%[6]	4,6 ± 0,7	14,0 ± 2,2	18,6
Vitamina (Tiaminose)[*]	17,6 ± 3,2	86,1 ± 0,9	103,7
Vitamina (Dextrovitase)[**]	3,8 ± 0,1	10,2 ± 0,2	10,2
Vitamina (Frutovena)[***]	40,2 ± 6,7	21,5 ± 1,7	61,7
Aminoácidos 10%[3]	n.d	2,5 ± 0,1	2,5
Aminoácidos 10%[1]	n.d	15,4 ± 2,3	15,4
Aminoácidos 10%[2]	n.d	41,0 ± 0,9	41,0
Aminoácidos 8%[2]	4,4 ± 0,4	16,7 ± 1,2	21,1
Aminoácidos 8%[2]	6,8 ± 1,0	87,9 ± 5,7	94,7
Emulsão lipídica 10%[2]	n.d	0,9 ± 0,3	0,9
Emulsão lipídica 20%[2]	n.d	1,7 ± 0,6	1,7
Heparina 5000 Ul/mL[7]	39,5 ± 2,3	17,2 ± 2,8	56,7
Heparina 5000 Ul/mL[8]	23,3 ± 1,2	79,4 ± 4,9	79,4

Fonte: [4]
n.d: Não detectado.
[1]B. Braun, [2]Fresenius, [3]Baxter, [4]Halex Istar, [5]JP, [6]Merck, [7]SEM, [8]Elkins Sinn, [9]Ariston, [10]Geyer, [11]Hipolabor
[*]Glicose 3 g, ácido ascórbico 0,25 g, cloridrato de taiamina 0,015 g em 10 mL
[**]Glicose 2 g, ácido ascórbico 2 g, cloridrato de piridoxina 20 mg, nicotinamida 30 mg, riboflavina em 20 mL
[***]Frutose 5 g, ácido ascórbico 1 g, cloridrato de piridoxina 20 mg, pantotenato de sódio 10 mg, riboflavina 4 mg em 20 mL

Existem vários relatos descrevendo a conversão de espécies de As durante o aquecimento [39]. Com estudos feitos com soluções padrão de frutos do mar sujeitas a temperaturas de 160 °C por períodos de 30 minutos e 24 horas foi observado a transformação de AsB em TMAO e TMA^+, MMA em As(III) e As(V) [40].

Devido às implicações toxicológicas em torno da presença de espécies de arsênio nos produtos que contêm matérias orgânicas, é de grande interesse obter informações sobre a possível transformação das espécies de arsênio durante o processo de aquecimento [41].

Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de formação de espécies de As orgânico (DMA(V) e MMA(V)) devido a reação de metilação das espécies de As inorgânico (As(III) e As(V)) com compostos orgânicos das soluções de nutrição parenteral que são contaminados por tais espécies de As inorgânicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instrumentação

Sistema de purificação de água Mili-Q Milipore (resistividade 18,2 MΩ.cm)

Agitador magnético com aquecimento Heidolph MR 2002

Sistema de HPLC composto por bomba LC-10 As Shimadzu, coluna Hamilton PRP-X 100

Bomba Peristáltica Multicanal Ismatec

Espectrômetro de absorção atômica Varian SpectrAA 200, equipado com gerador de hidretos VGA 77

Balança analítica Sartorius com precisão de 0,1 mg

Potenciômetro Digital DM 20 Digimed

Autoclave Vertical Phoenix A V 50 N 6281

2.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho estão listados no Apêndice1 As soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura, a qual sofreu processo de destilação, deionização e purificação em sistema Mili-Q. Foram utilizados recipientes de vidro e plástico descontaminados, conforme descrito no item 2.3.

As soluções analíticas de As (III), As (V), DMA(V) e MMA(V) foram obtidas a partir de soluções estoques de 1000 mg L^{-1}, preparadas pela dissolução das quantidades apropriadas de As_2O_3, $Na_2HAsO_4.7H_2O$, $(CH_3)_2AsO_2Na.3H_2O$ e $CH_3AsO_3Na_2$, respectivamente. O As (III) foi dissolvido mediante aquecimento até a ebulição por alguns minutos até sua completa dissolução.

O eluente das espécies de As (DMA(V), MMA(V), As(V)) da etapa de "clean up" constitui de uma solução de 10 mM de $(NH_4)H_2PO_4$, preparada a partir da dissolução do sal.

A fase móvel do HPLC que constitui de uma solução de 10 mM $(NH_4)H_2PO_4$ foi preparada a partir da dissolução do sal e ajustada a pH 6,0 pela adição de NH_4OH 10% (v/v).

A solução de $NaBH_4$ 1% (m/v) foi preparada diariamente pela dissolução do sal em hidróxido de sódio 1% (m/v)

As soluções comerciais, assim como suas composições estão listadas na Tabelas 6 e 7.

2.3 Controle da Contaminação

Para garantir superfícies livres de contaminação, fez-se o uso de material plástico (polietileno e polipropileno) para armazenar as soluções utilizadas no presente estudo. Os recipientes foram deixados em contato com solução de 10% de HNO_3 em etanol (v/v), por, no mínimo, 48 horas, sendo lavados posteriormente com água purificada, antes de serem utilizadas [38].

Os recipientes de vidro foram lavados com detergentes, e enxaguados com água ultrapura em abundância, para garantir uma superfície livre de contaminação orgânica, e para uma descontaminação mais eficiente, estes foram deixados em contato na solução de descontaminação de HNO_3 10% em etanol.

2.4 Desenvolvimento das condições de especiação

2.4.1 Escolha das condições para a determinação das espécies de arsênio por HGAAS

A determinação das espécies de arsênio contida em cada alíquota é feita pela medida em fluxo contínuo por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS) (Figura 3). Cada espécie de arsênio foi aspirada numa vazão de 8 $mL.min^{-1}$, e as soluções de HCl e $NaBH_4$ 1% (m/v) em NaOH 1% (m/v) a 1$mL.min^{-1}$, a partir de seus respectivos recipientes, por bomba peristáltica, tendo sido gerada a arsina que é separada em um separador gás-líquido e, então, carreada por um fluxo contínuo de gás inerte, N_2, à cela de atomização, a qual foi aquecida por um controlador eletrotérmico. As condições otimizadas do equipamento estão descritas no Apêndice 4.

Para as espécies orgânicas de As (DMA e MMA(V)) preparou-se 50 mL de solução com concentrações variáveis de cisteína (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 3,0 % (m/v)) e 10 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécie, desta maneira deixou-se a reação ocorrer por 60 minutos. A medida realizou-se também com várias concentrações do redutor, $NaBH_4$ (1,0; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 % (m/v)) em NaOH 1% (m/v) e HCl 6 M. Fez-se a medida das soluções das espécies de As orgânicas em concentração de 20 $\mu g.L^{-1}$ sem a adição da cisteína. As medidas foram realizadas contra curva de calibração feita com As(III), $NaBH_4$ 1% (m/v) em 1% (m/v) de NaOH e HCl 6 M.

Para o estudo do tempo de reação necessário para a reação de pré-redução preparou-se 50 mL de solução de 20 $\mu g.L^{-1}$ de DMA em concentrações variadas de cisteína (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 e 1,5% (m/v)), e observou-se a reação nos tempos 10; 30; 60; 120 e 180 minutos. A medida realizou-se em $NaBH_4$ 2,0% (m/v) em 1% de NaOH (m/v) e HCl 6 M.

Figura 3: Aparelho de HG-AAS.

2.4.2 Escolha das condições cromatográfica.

O sistema de HPLC mostrado na Figura 4 foi montado para separar as espécies de arsênio, DMA(V), MMA(V) e As (V). Este consiste de uma solução de 10 mM de $(NH_4)H_2PO_4$ em pH 6,0 como fase móvel e uma coluna aniônica Hamilton PRP-X 100 (250 X 4.1mm) como fase estacionária.

A eluição cromatográfica foi realizada operando na bomba de HPLC um programa de vazão, 0,6 mL min^{-1} até 13min e 1,5 mL min^{-1} até 25 min.

A amostra foi condicionada em uma alça de amostragem de 500 µL. Após a amostra ser injetada, ela passa por uma coluna aniônica onde as espécies de arsênio são separadas.

As alíquotas referentes aos tempos 7 à 10, 11 à 15 e de 20 à 25 minutos são coletadas em frascos de plásticos (polietileno) de 15 mL, aferidas a um volume de 5 mL e, a determinação das concentrações das espécies de As realizou-se no HG-AAS.

Estão descritas resumidamente as condições utilizadas para o sistema de HPLC no Apêndice 3.

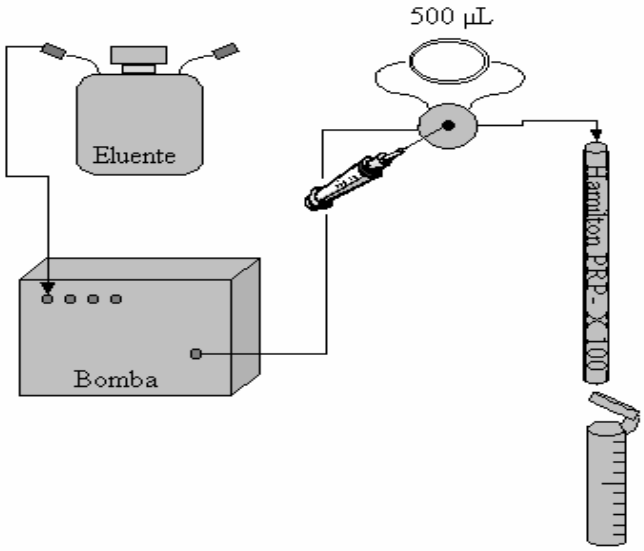


Figura 4: Sistema de HPLC usado para a separação das espécies de arsênios.

Foi preparada uma solução de 10 mM de $(NH_4)H_2PO_4$ em pH 9,0 e injetou-se soluções de 10 mg L^{-1} das espécies de arsênio em uma alça de amostragem de 20 µL, em vazão de 1 mL min^{-1}.

Estudou-se a separação do As(III) e DMA(V) nas mesmas condições citadas acima, porém, variou-se as vazões: 0,8; 0,7; 0,6; 0,5 e 0,4 mL min^{-1}.

Observou-se a separação do As(III) e do DMA(V) em eluente com pH 8,0 nas vazões de 1 e 0,6 mL min^{-1}.

Fez-se o estudo da eluição dessas duas espécies de arsênio (As(III) e DMA(V)) em pH 7,0 numa vazão de 1mL min^{-1}, sucedendo o estudo em pH 6,0 nas vazões de 1,5; 1; 0,8; 0,7 e 0,6 mL min^{-1}. Também se averiguou a separação em pH 5,0 nas vazões 1,0; 0,8; 0,6 e 0,4 mL.min^{-1}.

Com as condições escolhidas, realizou-se o estudo de programas de vazão. Averiguou-se a separação das espécies de As em uma alça de amostragem de 500 µL, preparou-se 25 mL de solução de cada espécie de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em uma concentração de 100 µg.L^{-1} e injetou-se tais soluções no sistema cromatográfico. Para uma separação adequada observou-se diferentes programas de vazão.

2.5 Escolha das condições para a etapa de "Clean up"

Com a ajuda de uma bomba peristáltica operando numa vazão de 0,3 mL.min^{-1} realizou-se uma etapa de "clean up" das espécies de As, passando 2 µg das diferentes formas de As, através de coluna com aproximadamente 15 cm de comprimento, contendo 1 g de resina trocadora de ânions fortemente básica, Amberlit IRA-410, a eluíção sucedeu-se com 30 mL de 10 mM de $NH_4H_2PO_4$ numa vazão de 1,0 mL.min^{-1} (Figura 5). As condições adequadas estão descritas no Apêndice 2.

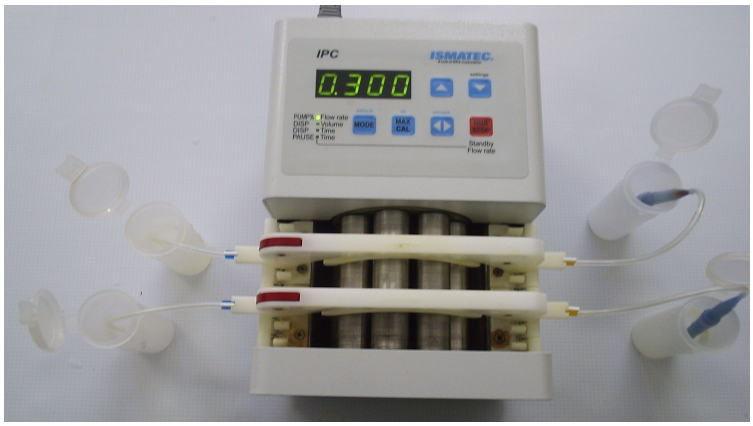


Figura 5: Sistema de "clean up"

Investigou-se o comportamento da retenção das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em várias faixas de pH de suas respectivas soluções. Ajustou-se a bomba peristáltica a uma vazão de 0,5 mL min^{-1}, a qual forçou a passagem através de colunas contendo resina Amberlite IRA-410 50 mL de solução contendo 10 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécie de As. Soluções de As(III) foram preparadas nas seguintes faixas de pHs: 4,5; 7,0; 8,0; 9,0; 10.0; 11,0; 12,0. Soluções de DMA(V) nas seguintes faixas de pH: 4,5; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0. Soluções de MMA(V), nas faixas de pH: 4,5, 7,0, e 8,0 e soluções de As(V) nas faixas de pHs: 4,5; 7,0; 8,0; 9,0; 12,0.

Preparou-se 50 mL de solução de As(III) numa concentração de 10 $\mu g.L^{-1}$ em pH 12,0 para estudar a retenção desta espécie de As nas seguintes vazões 0,4; 0,3; 0,2; e 0,1 $mL.min^{-1}$.

O melhor eluente para a dessorção das espécies de As da coluna foi estudado. Operou-se a bomba peristática em 0,3 $mL.min^{-1}$ para a etapa de "clean up" e 1,0 $mL.min^{-1}$ para a eluição, e testou-se as seguintes condições indicadas na Tabela 4.

Verificou-se se o eluente da etapa de "clean up" não interferiria na separação cromatográfica. Para isto, preparou-se soluções de 100 $\mu g.L^{-1}$ de As em soluções dos eluentes e, injetou-se no sistema cromatográfico.

Após cada utilização da resina, realizou-se sua regeneração, passando através dela, 10 mL de uma solução de HCl 2 M, e logo após lavou-se com água destilada e deionizada em abundância até o papel indicador de pH acusar a neutralidade.

Tabela 4 - Eluentes e condições para o estudo da dessorção das espécies de As.

Eluente	Espécie de As Retida	Vol. da solução. (mL)	Conc.da solução. ($\mu g.L^{-1}$)	Vol.do Eluente. (mL)
HCl 2M	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
$NH_4H_2PO_4$ 10 mM pH 6,0	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
NH_4Cl 5 M	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
NH_4Cl 2 M pH 4,0	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
NH_4Cl 2 M pH 6,0	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
NH_4Cl 2 M pH 8,5	DMA(V), MMA(V) e As(V)	100	10	10
NH_4Cl 0,1 M	As(V)	100	2,0	10
NH_4Cl 0,2 M	As(V)	100	2,0	10
NH_4Cl 0,2 M	DMA(V), MMA(V)	20	80	10
$NH_4H_2PO_4$ 10 mM pH 8,0	As(V)	15	40	10
$NH_4H_2PO_4$ 10 mM	As(V)	25	80	10
NH_4Cl 50 mM	MMA(V)	25	80	10
NH_4Cl 20 mM	MMA(V)	25	80	10
NH_4Cl 10 mM	MMA(V)	25	80	10
$NH_4H_2PO_4$ 50 mM	MMA(V)	20	80	10

2.6 Investigação sobre formação de As orgânico após o processo de esterilização de soluções de aninácidos, glicose e vitaminas.

Preparou-se separadamente 50 mL de soluções aquosas contendo uma concentração de 80 µg L^{-1} de cada espécie de As inorgânico (As(III) e As(V)) . Com uma pipeta volumétrica de 25 mL transferiu-se, tal volume, de cada solução para frascos de vidro os quais foram colocados em autoclave onde as soluções foram submetidas ao processo de esterilização 121 °C por 30 min.

Logo a seguir ajustou-se o pH das soluções, esterilizadas e não esterilizadas, a uma faixa de 7,0 a 8,0, procedeu-se a etapa de "clean up", passando através da coluna 20 mL de cada solução, sendo recolhido o efluente e o eluato que é injetado no sistema de HPLC para a separação cromatográfica. Procedeu-se o mesmo método para a água ultrapura do Mili-Q.

Preparou-se 50 mL de solução de cada substância listada na Tabela 5 em uma concentração de 0,1% e uma adição de 80 µg L^{-1} As(III) e As(V) , então procedeu-se da mesma maneira como descrito acima para soluções aquosas. Também realizou-se a metodologia para o branco de cada substância.

Realizou-se o teste de interferência matricial nas recuperações das espécies de As (As(III), DMA(V),MMA(V) e As(V)), preparou-se uma solução de 0,1% de glicose com adição de uma concentração de 80 µg.L^{-1} de As total, nas seguintes combinações: A(V), MMA(V), DMA(V), As(V) + MMA(V) + DMA(V), As(III) + DMA(V) + MMA(V), As(III) + DMA(V) + MMMA(V) + As(V). Estas soluções passaram através da coluna de "clean up" contendo resina IRA-410 em uma vazão de 0,3 mL.min^{-1} e a eluíção, sucedeu-se pela passagem de uma solução de 10 mM de $NH_4H_2PO_4$ em uma vazão de 1 mL.min^{-1}, coletou-se o efluente e as alíquotas do eluato referentes aos volumes 10, 20 e 30 mL, mediu-se a concentração de As existente no efluente, bem como nas alíquotas por HG-AAS

Tabela 5 - Substâncias usadas para o estudo da formação de As orgânico.

Substância	Fornecedor	Fórmula Molecular	Massa Molecular ($gmol^{-1}$)
L-Glicina	Vetec	$C_5H_5NO_2$	75,07
L-Serina	Vetec	$C_3H_7NO_3$	105,09
L-Metionina	Merck	$C_5H_{11}NO_5S$	149,21
Ácido Aspártico	Aldrich	$C_4H_7NO_4$	133,5
Fenilalanina	Vetec	$C_9H_{11}NO_2$	165,19
Glicose	Belga	$C_{12}H_{22}O_{12}$	358,1
Ácido Ascórbico	Vetec	$C_6H_8O_6$	176,3
Cianocobalamina	Farmácia Dermapele	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1355,388

2.7 Ensaios de Recuperação das espécies de As nas amostras comerciais

Para este fim, utilizou-se 250 µL das amostras comerciais, descritas nas Tabela 6 e 7, e as diluiu em um volume final de 25 mL, as amostras foram fortificadas com 50 µg L^{-1} de cada espécie de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) e submeteu-as ao método proposto.

2.8 Determinação das espécies de As nas soluções comerciais

Soluções comerciais que são usadas nas soluções de nutrição parenteral foram analisadas pelo método proposto, a fim de determinar a concentração e as espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)). Analisou-se pelo menos uma amostra de cada grupo de constituintes das soluções de nutrição parental, tal como carboidratos, aminoácidos e vitaminas. Nas Tabelas 6 e 7 estão descritas as formulações de cada solução empregada no presente trabalho.

Tabela 6 - Concentração (g/L) dos aminoácidos em formulações comerciais.

Formulações Aminoácidos	Aminoplasmal L 10 A	Nefroamino AEH	Aminoped 10%	Aminoesteril Hepa 8%
L-isoleucina	5,1	7,0	6,4	10,4
L-leucina	8,9	11,0	10,7	13,1
L-lisina	7,9	11,3	7,1	6,9
L-metionina	3,8	11,0	4,6	1,1
L-cisteína	0,6	-	0,4	0,5
L-fenilalanina	5,1	11,0	4,6	0,9
L-treonina	4,1	5,0	5,1	4,4
L-triptofano	1,8	2,5	1,8	0,7
L-valina	4,8	8,0	7,1	10,1
L-arginina	9,2	-	6,4	10,7
L-histidina	5,2	5,5	4,1	2,8
L-alanina	13,7	-	7,2	4,6
L-serina	2,4	-	9,0	2,2
L-prolina	8,9	-	16,2	5,7
L-tirosina	1,6	-	5,5	
L-ácido málico	-	-	4,8	-
Ácido acético	-	-		7,2
L-ornitina	3,2	-	-	-
L-asparagina	1,3	-	-	-
L-ácido aspártico	8,9	-	-	-
L-ácido glutâmico	4,6	-	-	-
L-cistina		-	-	-
Glicina	7,9	-	4,1	5,8

Tabela 7 - Concentração (g/10mL) das vitaminas em formulações comerciais.

Substância	Frutovena	Ácido Ascórbico	Citoneurin
Frutose	2,5	-	-
Ácido ascórbico	1,0	1	-
Riboflavina fosfato de sódio	0,002	-	-
Cloridrato de piridoxina	0,01	-	-
Nicotinamida	0,015	-	-
Cianocobalamina	-	-	0,0002
Piridoxina	-	-	0,001
Tiamina	-	-	0,0005

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento das condições de especiação

As formulações que constituem as soluções de nutrição parenteral são matrizes extremamente complexas e muito variadas.

Assim, como o objetivo foi observar a possibilidade de reação dessas matrizes com as espécies de As inorgânico na formação de espécies de As orgânico (DMA(V) e MMA(V)), fez-se a escolha das soluções de acordo com sua natureza. Desta forma, utilizou-se apenas soluções com substâncias orgânicas, tais como: glicina, serina, metionina, ácido aspártico, fenilalanina como soluções de aminoácidos; glicose como soluções de carboidratos e ácido ascórbico e cianocobalamina como soluções de vitaminas.

Para a análise de especiação das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)), buscou-se uma metodologia eficiente e sensível. Um sistema de HPLC, para a separação das espécies de As, e a detecção por HG-AAS, para a quantificação da concentração das espécies de As.

Apesar da coleta de frações, a detecção off-line, isto é o detector não acoplado ao sistema de cromatografia, HG-ASS possui uma grande vantagem em relação à detecção condutimétrica on-line (acoplado ao sistema de cromatográfico). A alta sensibilidade da técnica de geração de hidretos permite uma detecção de até 0,5 µg. L^{-1} enquanto que a faixa de limite de detecção condutimétrica é de 0,5 a 150 mg.L^{-1} é bastante elevada para elementos como o As [42].

3.2. Escolha das condições para a determinação das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) por HGAAS

A técnica de geraçãode hidretos é largamente usada para a determinação de As em níveis traço, pois possui alta sensibilidade, precisão, simplicidade, rapidez e baixo custo [43-45].

A grande diferença na sensibilidade das medidas no HGAAS entre As(III) e As(V) em condições usuais, tem sido relatadas. Vijan et al. encontrou uma diferença de sensibilidade de 25 a 30% maior para o As(III). [46, 47]

Brindle et al. descreve o efeito benéfico da cisteína na geração de hidretos do arsênio. A adição de cisteína nas soluções das amostras facilita a reação de formação de hidreto, reduz interferências na fase líquida e pré-reduz As(V) a forma trivalente [48].

Como a sensibilidade da medida espectrométrica é dependente da cinética de reação de redução, a adição de um pré-redutor nas soluções de As (DMA(V) e MMA(V)) auxilia na formação mais rápida da arsina [45, 49].

Por este motivo, estudou-se o comportamento da determinação do MMA(V) e DMA(V) por HGAAS com a adição de diferentes concentrações de cisteína nas soluções destas espécies de As, bem como a variação da concentração do redutor $NaBH_4$ (Tabela 8 e 9)

Estudou-se também o tempo de reação mais eficiente para ocorrer a pré-redução.(Tabela 10).

Para fazer a determinação das quatro espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em relação, apenas, à uma curva de calibração, optou-se por realizar as medidas com a curva de calibração do As(III), que possui o sinal espectrométrico mais sensível dentre as espécies de As.

Tabela 8 - Estudo da concentração da cisteína em várias concentrações de $NaBH_4$ para aumentar a sensibilidade da medida espectrométrica do DMA(V) Tempo de reação de 60 minutos.

DMA(V)					
	$NaBH_4$ (%)				
	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5
Cisteína (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
0	17,1	30,9	49,6	34,4	50,7
0,1	28,5	94,1	99,9	48,9	59,4
0,5	28,2	64,0	62,5	64,2	72,5
1,0	45,3	65,3	54,6	61,1	63,4
1,5	40,4	20,4	46,9	58,7	61,7
3,0	53,3	41,1	41,4	48,9	48,7

Tabela 9 - Estudo da concentração da cisteína em várias concentrações de $NaBH_4$ para aumentar a sensibilidade da medida espectrométrica do MMA(V) Tempo de reação de 60 minutos.

MMA(V)					
	$NaBH_4$ (%)				
	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5
Cisteína (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
0	36,3	82,5	52,3	54,3	48,9
0,1	28,6	67,3	52,4	65,7	63,2
0,5	24,9	53,2	47,5	56,7	51,8
1,0	9,6	25,9	21,3	32,1	33,3
1,5	9,9	24,0	18,8	35,4	35,2
3,0	7,4	20,5	15,2	32,1	22,4

A sensibilidade do sinal do DMA(V) aumentou, com a adição de 0,1% de cisteína e utilizando um redutor com concentrações de 2,0 e 2,5%.

Para o MMA(V) a adição de cisteína não melhorou a sensibilidade da medida estrofotométrica, mas com a utilização de uma solução de redutor em concentração de 2,0% conseguiu-se uma recuperação satisfatória de 82,5 % .

Tabela 10 - Estudo do tempo necessário para que ocorra a reação de pré-redução do DMA(V) em várias concentrações de cisteína em $NaBH_4$ 2,0%.

DMA(V)					
	Tempo (min)				
	10	30	60	120	180
Cisteína (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
0,1	13,6	13,2	94,1	38,5	43,1
0,2	-	-	42,9	40,7	39,6
0,3	-	-	43,1	50,2	44,9
0,4	-	-	45,5	60,9	49,8
0,5	42,5	44,7	61,1	64,3	63,9
1,0	71,1	61,8	68,8	-	-
1,5	96,5	92,7	20,4	-	-

-: Teste não realizado

O estudo do tempo necessário para que a reação de pré-redução ocorresse com mais eficiência para o DMA(V), mostrou que seria preciso 10 minutos de reação na presença de 1,5% de cisteína ou a adição de 0,1% e 60 minutos de reação.

Através destes estudos, concluiu-se que seria mais apropriado fazer uma curva de calibração para cada espécie de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)), pois não é conveniente preparar diferentes concentrações de redutor ($NaBH_4$) a cada medida.

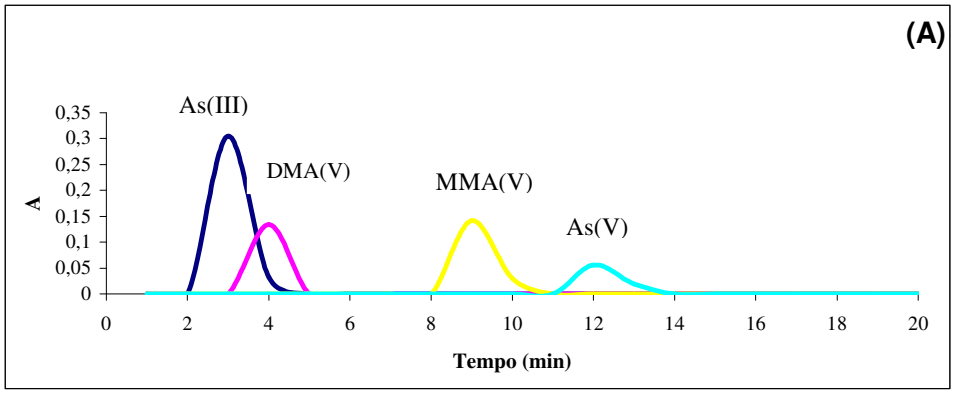
A adição de cisteína nas soluções de DMA(V) também não é conveniente, pois deve-se adicioná-la em cada fração recolhida, assim, necessitando de muito tempo.

Além disso, a medida espectrométrica deve ser realizada exatamente no tempo em que ocorre a reação de pré-redução devido ao oxigênio existente no ar, o qual reoxida rapidamente as espécies de As estudadas.

3.3 Escolha das condições cromatográfica.

Os pH da fase móvel, a vazão, bem como o tamanho da alça de amostragem podem influenciar na separação e no tempo de retenção dos analitos. Portanto, fez-se o estudo das condições mais indicadas para a separação das espécies de arsênio.

Utilizou-se uma coluna de troca aniônica, Hamilton PRP-X100, e como fase móvel 10 mM de $NH_4H_2PO_4$, ajustando-se o pH com NH_4OH [1].



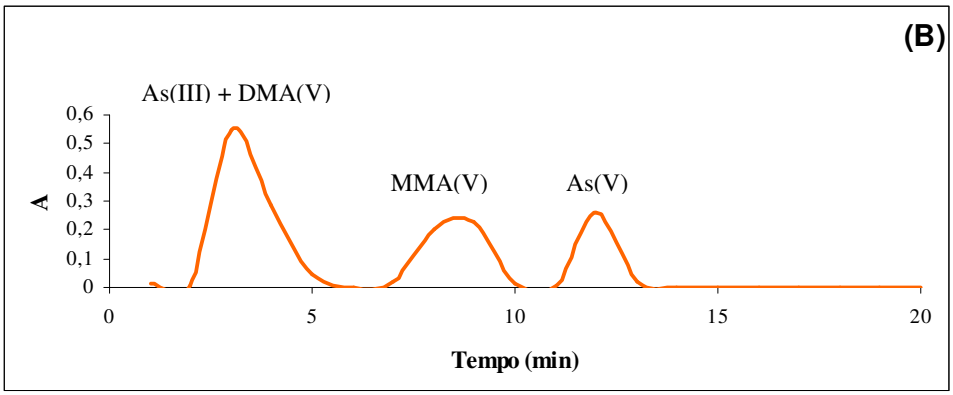
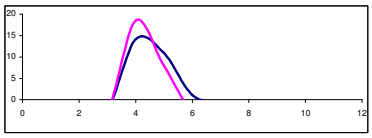
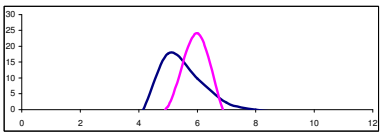
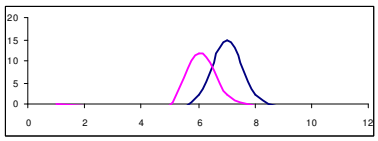
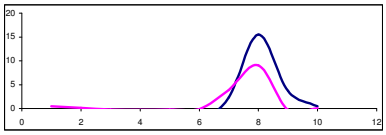
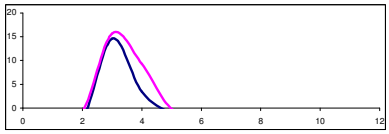
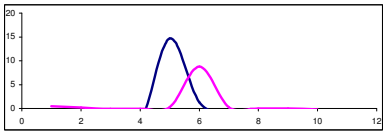
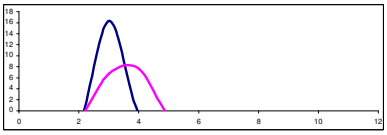
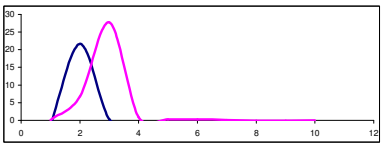
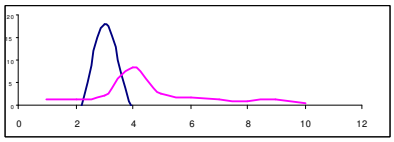
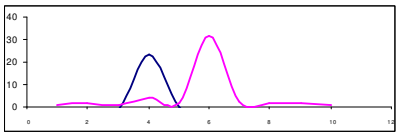
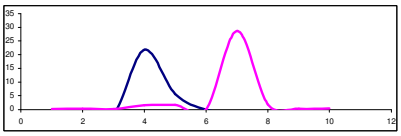
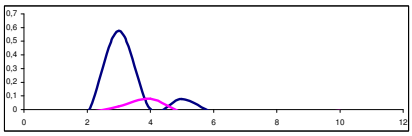
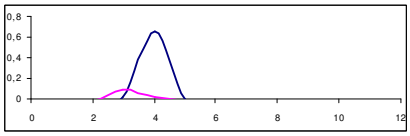
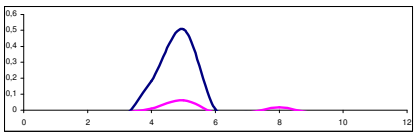
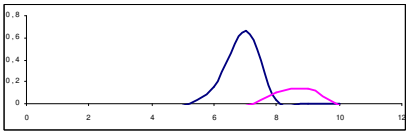


Figura 6: Cromatograma das frações de coletadas a cada minuto das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em fase móvel de 10 mM de $(NH_4)H_2PO_4$ em pH 9,0 e vazão de 1 mL. min^{-1}. (A) Injeção das quatro espécies de As separadamente. (B) Injeção de uma solução contendo todas as espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V), As(V)).

Nas Figuras 6 (A) e (B) observa-se que, nas condições em que foi realizada a separação, houve a sobreposição dos tempos de retenção do As(III) e do DMA(V). Assim sendo, foi necessário estudar outras condições, para uma melhor separação entre As(III) e DMA(V), tal como mostra a Tabela 11.

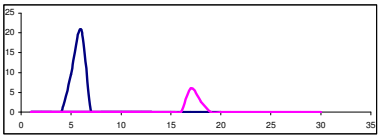
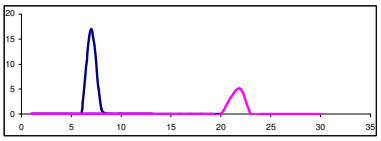
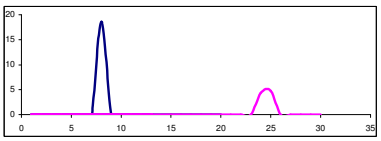
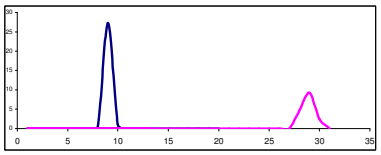
Tabela 11 - Estudo das condições cromatográficas para a separção de As(III) e DMA(V), em solução de 10 mg.L^{-1} utilizando $NH_4H_2PO_4$ como eluente e alça de amostragem de 20 µL.

pH do Eluente	Vazão (mL.min^{-1})	Cromatograma
9,0	0,8	
	0,7	
	0,6	
	0,5	

pH do Eluente	Vazão (mL.min^{-1})	Cromatograma
9,0	0,4	
8,0	1,0	
	0,6	
7,0	1,0	
6,0	1,5	
	1,0	
	0,7	
	0,6	
5,0	1,0	
	0,8	
	0,6	
	0,4	

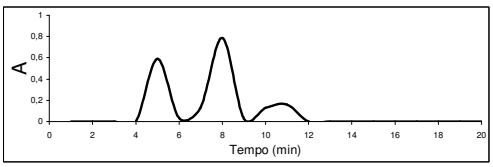
Concluí-se, que a separação do As(III) e DMA(V) foi mais efetiva em pH 6,0, já a melhor vazão foi 0,6 mL.min^{-1}. Assim, fez–se o estudo para conhecer os tempos de retenção do MMA(V) e As(V) com eluente neste pH variando–se as vazões (Tabela 12).

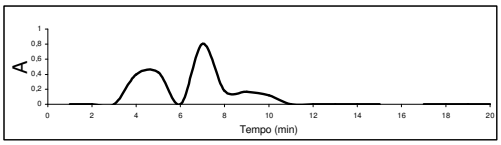
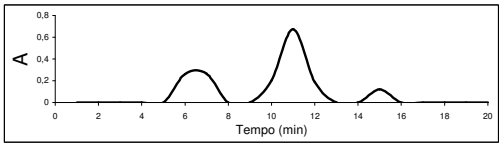
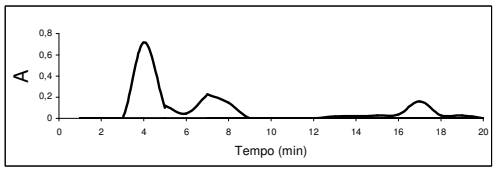
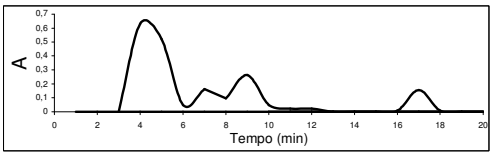
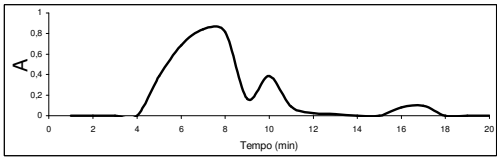
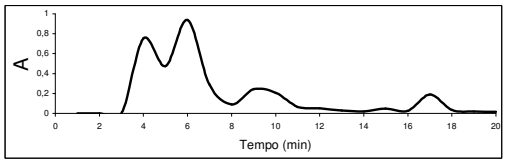
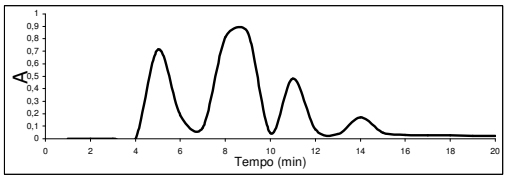
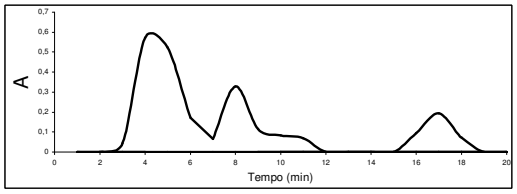
Tabela 12 - Estudo das condições cromatográficas para a separção de MMA(V) e As(V), em solução de 10 mg.L^{-1} utilizando como eluente$NH_4H_2PO_4$ em pH 6,0 e alça de amostragem de 20 µL.

pH do Eluente	Vazão (mL.min^{-1})	Cromatograma
6,0	1,0	
	0,8	
	0,7	
	0,6	

Com os resultados da Tabela 12, observa-se que se fizesse uso apenas da vazão de 0,6 mL.min^{-1}, que é a melhor vazão para a separação do As(III) e DMA(V), o tempo de corrida cromatográfica seria maior que 30 min, assim, fez-se o estudo de programas de vazões, para diminuir o tempo de coleta das frações e reduzir o tempo de análise (Tabela 13).

Tabela 13 - Programas de vazão para a separação do As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V) em solução contendo 10 mg.L^{-1} de cada espécie de As utilizando alça de amostragem de 20 µL.

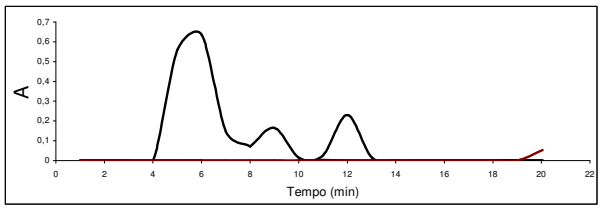
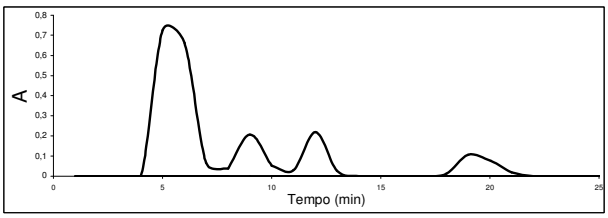
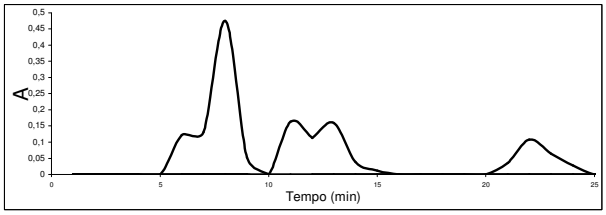
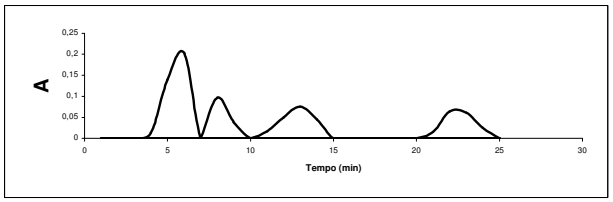
Vazão (mL.min^{-1})	Tempo (min)	Cromatograma
Programa de Vazão 1		
0,6	8	
0,5	12	
1,0	20	

Vazão ($mL.min^{-1}$)	Tempo (min)	Cromatograma
Programa de Vazão 2		
0,6	8	
0,4	14	
1,5	20	
Programa de Vazão 3		
0,6	8	
0,4	14	
1,0	20	
Programa de Vazão 4		
0,7	5	
0,6	8	
0,3	14	
2,0	20	
Programa de Vazão 5		
0,6	8	
0,3	14	
2,0	20	
Programa de Vazão 6		
0,6	5	
0,5	14	
2,0	20	
Programa de Vazão 7		
0,7	4	
0,5	6	
0,3	14	
2,0	20	
Programa de Vazão 8		
0,6	3	
0,4	5	
0,3	10	
2,0	20	
Programa de Vazão 9		
0,6	7	
0,4	14	
2,0	20	

O Programa de vazão 8 foi o único que separou as quatro espécies de As satisfatoriamente, com tempo de retenção de 5 minutos para As(III), 9 minutos para DMA(V), 11 minutos para MMA(V) e 14 minutos para As(V).

Mudou-se a alça de amostragem de 20 µL para 500 µL a fim de aumentar a concentração dos analitos, pois as alíquotas após serem recolhidas eram aferidas a um volume final de 5 mL, então fez-se o estudo do programa de vazão mais apropriado para a nova alça de amostragem (Tabela 14).

Tabela 14 - Programas de vazão do As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V) em solução contendo 100 µg.L^{-1} de cada espécie de As utilizando alça de amostragem de 500 µL

Vazão (mL.min^{-1})	Tempo (min)	Cromatograma
Programa de Vazão 1		
0,6	10	
1,5	20	
Programa de Vazão 2		
0,6	10	
1,5	15	
2,0	25	
Programa de Vazão 3		
0,6	10	
1,5	25	
Programa de Vazão 4		
0,6	13	
1,5	25	

Apesar da separação cromatográfica com programa de vazão 2 ser satisfatória, o uso de uma vazão máxima de 2,0 mL.min^{-1}, pode prejudicar a coluna, devido a uma grande pressão que é exercida. Portanto o programa de vazão 4 foi o mais indicado para a separação cromatográfica, o qual os tempos de retenção do As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V) são 6, 8, 13 e 23 minutos, respectivamente.

3.5 Escolha das condições para a etapa de "Clean up"

Os Métodos cromatográficos possuem altas sensibilidade e seletividade, por isto, mostram frequentemente desvantagens devido às interferências da matriz [50]. Por exemplo, amostras que possuem uma grande quantidade de proteínas que podem precipitar quando em contato com solventes ou tampões de sais comumente usados como fase móvel, assim bloqueando a passagem, causando aumento da pressão ou deterioração da coluna [51].

Existem várias técnicas utilizadas previamente à injeção no sistema cromatográfico para a remoção das matrizes, como a extração por fase sólida de substratos realizando o "clean up" das amostras melhorando a separação cromatográfica [50].

Soluções de nutrições parenterais possuem uma grande quantidade de constituintes orgânicos que podem prejudicar a coluna cromatográfica, por este motivo, realizou-se uma etapa de "clean up", antecedente à etapa cromatográfica, que separasse a matriz complexa das espécies de As.

Espécies aniônicas como As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V), podem ser retidas em resinas trocadoras de íons, resinas aniônicas fortemente básicas são as mais usadas para este fim [31].

Resinas trocadoras de ânions são polímeros contendo grupos amina (ou amônio quaternário) como parte integral da rede de polímeros e um número equivalente de ânions, como íons cloreto, hidroxilas ou sulfato [33].

As resinas trocadoras de anions contêm ânions livres que podem ser permutados por ânions em soluções como ilustra a equação 11.

$$(\text{ResinaC}^+)\text{A}^- + \text{B}^-_{(\text{solução})} \leftrightarrow (\text{ResinaC}^+)\text{B}^- + \text{A}^-_{(\text{solução})} \qquad (11)$$

Estes ânions podem ser removidos pela permutação por outros ânions através da passagem de uma solução regeneradora da resina.

Portanto, utilizou-se para este estudo uma resina de troca aniônica, fortemente básica Amberlit IRA-410.

3.5.1. Efeito do pH na retenção das espécies de As

O pH é um importante fator na distribuição do soluto, com acentuado propriedades ácido-base, entre a fase estacionária e a fase móvel, com acentuado propriedades ácido-base. As quatro espécies de arsênio investigadas são consideradas ácidos fracos e com constantes de dissociação completamente diferentes, como mostrados na Tabela 15 [31, 32].

Estudou-se a retenção das espécies de As na resina em solução com diferentes faixas de pH ajustado com solução de NH_4OH (Tabela 16), as equações 12.1 a 15 mostram as reações de dissociação dos compostos de As investigados neste trabalho.

Tabela 15 - pKa e estruturas dissociadas das espécies de As

	Espécie de Arsênio			
	As(III)	DMA(V)	MMA(V)	As(V)
pKa_1	9,3	6,2	3,6	2,3
pKa_2			8,2	6,8
pKa_3				11,3

Fonte:[15, 37]

$$As_4O_6 + 12\ NH_4OH \rightarrow 4(NH_4)_3AsO_3 + 6\ H_2O \quad (12.1)$$

$$(NH_4)_3AsO_3 + 3\ OH^- \rightarrow AsO_3^{3-} \quad (12.2)$$

$$(CH_3)_2AsONa + OH^- \rightarrow (CH_3)_2AsO^- \quad (13)$$

$$(CH_3)AsO_2\ Na_2 + 2\ OH^- \rightarrow (CH_3)AsO_2^{2-} \quad (14)$$

$$Na_2HAsO_4 + 3\ OH^- \rightarrow OAsO_3^{3-} \quad (15)$$

Tabela 16 - Retenção de 10 µg.L^{-1} de cada espécies de As em função do pH de suas soluções em vazão de 0,5 mL.min^{-1}.

	As(III)		DMA(V)		MMA(V)		As(V)	
pH	Efluente (µg.L^{-1})	Retido (%)	Efluente (µg.L^{-1})	Retido (%)	Efluente (µg.L^{-1})	Retido (%)	Efluente (µg.L^{-1})	Retido (%)
4,5	10,0	0	7,9	21,0	0,6	94,0	0,4	96,0
6,0	11,0	0	2,0	80,0	n.d	100	n.d	100
7,0	10,1	0	n.d	100	-	-	0,8	92,0
8,0	10,5	0	n.d	100	n.d	100	n.d	100
9,0	11,0	0	n.d	100	-	-	0,2	98,0
10	9,12	8,8	n.d	100	-	-	-	-
11	3,5	65,3	-	-	-	-	-	-
12	1,4	85,6	-	-	-	-	0,6	94,0

nd: Não detectado
- : Teste não realizado

Os resultados na Tabela 16 mostram que o As(V) ficou retido em praticamente todos os pHs investigados, confirmando maior interação com a resina. O MMA(V) também é capaz de ficar retido na resina mesmo em pH ácido, mostrando uma retenção razoável em pH 4,5. O DMA(V) apresenta uma retenção efetiva a partir de soluções em pH superior a 6,0, enquanto que para o As(III) é necessário um pH igual ou superior a 12,0.

Isto pode ser melhor explicado através da Equação 16, que mostra que quanto maior o pKa maior deverá ser o pH para que ocorra a dissociação, ou seja, a formação do ânion.

$$pH = pKa + \log_[A^-] / [HA] \quad (16)$$

Escolheu-se para o desenvolvimento desta etapa faixa de pH 7,0 a 8,0, pois em soluções com pH mais elevado a resina pode ser danificada.

Como nesta faixa de pH o As(III) não fica retido, este é recolhido e quantificado no efluente.

3.5.2. Efeito da vazão na retenção do As(III)

A retenção depende do tempo necessário para que ocorra o equilíbrio do analito entre a fase aquosa e a fase sólida.

A fim de observar uma retenção mais eficiente do As(III) preparou-se uma solução em pH 12,0 e investigou-se em várias vazões, como ilustrado na Tabela 17.

Como as outras três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) ficaram eficientemente retidas na resina apenas com ajuste de pH não foi necessário realizar este teste com estas espécies.

Tabela 17 - Variação da vazão para o estudo da retenção do As(III) em solução em pH 12,0.

Vazão ($mL.min^{-1}$)	Efluente ($\mu g.L^{-1}$)	Retido (%)
0,4	1,3	87,0
0,3	0,5	95,0
0,2	0,8	92,0
0,1	0,6	94,0

Os resultados mostram que a melhor vazão para que o As(III) fique mais retido é 0,3 $mL.min^{-1}$.

3.5.3. Escolha do eluente para a dessorção das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)).

O eluente considerado mais adequado, para a retirada das três espécies de As que ficaram retidas na resina, deveria ser uma solução aquosa cujo pH, concentração e espécie de ânion trocador não interferissem no sistema de HPLC, no qual as espécies de As serão separadas, e que a eluíção dessas espécies de As fosse bastante eficiente, ou seja, uma recuperação satisfatória. Os eluentes testados, assim como, as recuperações das espécies de As após a eluíção em um volume de 10 mL estão indicados na Tabela 18.

Tabela 18 – Estudo do eluente mais adequado para a dessorção, em 10 mL, das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em vazão de 1 $mL.min^{-1}$.

Eluente	Concentração	pH	DMA(V) Recuperação (%)	MMA(V) Recuperação (%)	As(V) Recuperação (%)
HCl	2 M	s/ ajuste	89,1	101,9	108,9
$NH_4H_2PO_4$	10 mM	6,0	72,0	79,7	91,6
NH_4Cl	5 M	s/ ajuste	69,7	85,0	89,2
NH_4Cl	2 M	4,0	95,4	83,3	94,3
NH_4Cl	2 M	6,0	82,3	84,3	81,8
NH_4Cl	2 M	8,5	72,5	85,1	94,4
NH_4Cl	0,1 M	s/ ajuste	-	-	61,7
NH_4Cl	0,2 M	s/ ajuste	96,7	101,4	75,5
$NH_4H_2PO_4$	10 mM	8,0	-	-	8,2

Eluente	Concentração	pH	DMA(V)	MMA(V)	As(V)
			Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
$NH_4H_2PO_4$	10 mM	s/ ajuste	-	-	81,9
NH_4Cl	50 mM	s/ ajuste	-	87,8	-
NH_4Cl	20 mM	s/ ajuste	-	67,3	-
NH_4Cl	10 mM	s/ ajuste	-	67,2	-
$NH_4H_2PO_4$	50 mM	s/ ajuste	-	99,2	-

-: Estudo não realizado.

Com base nos dados da Tabela 18 que mostra a recuperação das espécies de As para cada eluente testado, observa-se que as soluções HCl 2 M, NH_4Cl 2 M em pH 4,0 e 6,0, NH_4Cl 0,2 M, NH_4PO_4 10 mM, NH_4Cl 50 mM e $NH_4H_2PO_4$ 50 mM, podem ser empregados para a dessorção das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V))que ficaram retidas na resina de troca aniônica.

Verificou-se se estes eluentes não interfereriam na separação cromatográfica das espécies de As, para isto preparou-se soluções de cada espécie de As em soluções contendo as substâncias eluentes e, injetou-se no sistema cromatográfico (Figuras 7 a 12).

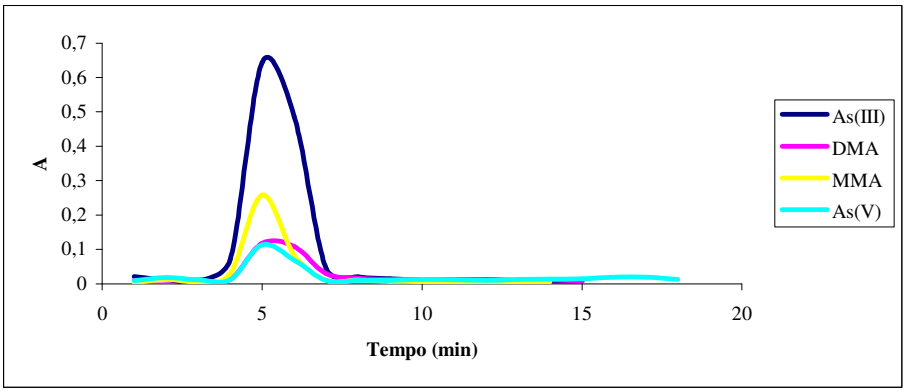


Figura 7: Cromatograma das espécies de As em solução de 2 M de HCl. Concentração de cada espécie de As 100 µg.L^{-1}.

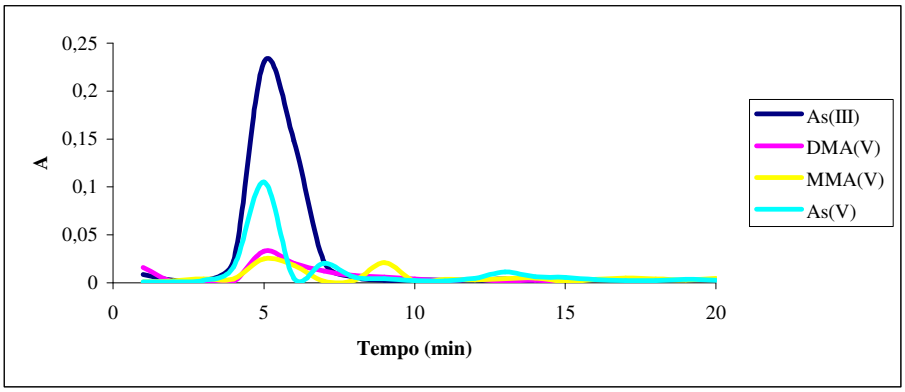


Figura 8: Cromatograma das espécies de As em solução de 5M de NH_4Cl Concentração de cada espécie de As 100 µg.L^{-1}.

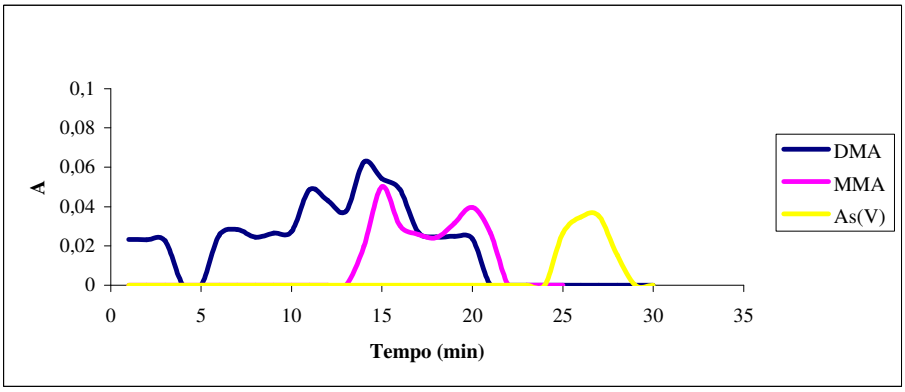


Figura 9: Cromatograma das espécies de As em solução de 0,2M de NH_4Cl Concentração de cada espécie de As 100 µg.L^{-1}.

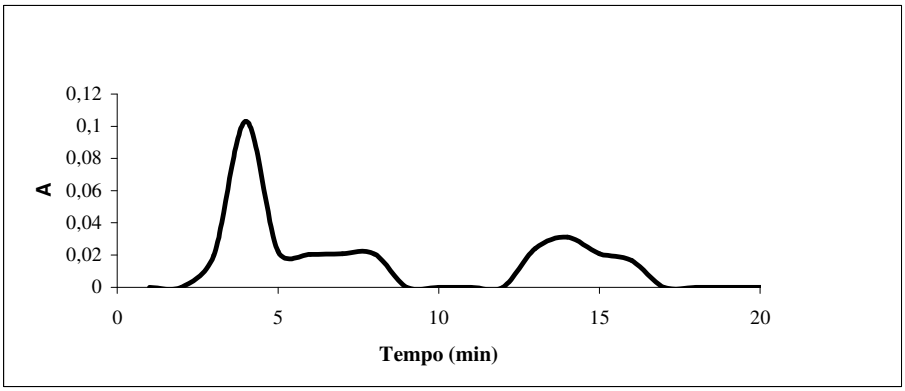


Figura 10: Cromatograma do MMA(V) em solução de 50 mM de NH_4Cl Concentração da espécie de As 100 µg.L^{-1}.

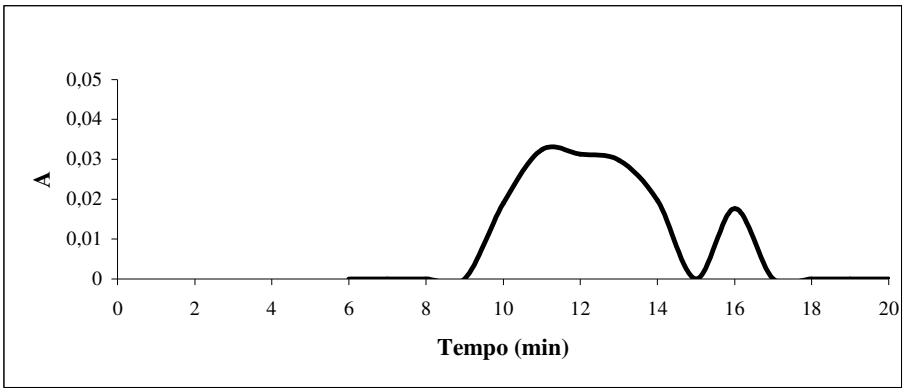


Figura 11: Cromatograma do MMA(V) em solução de 50 mM de $NH_4H_2PO_4$ Concentração da espécie de As 100 µg.L^{-1}.

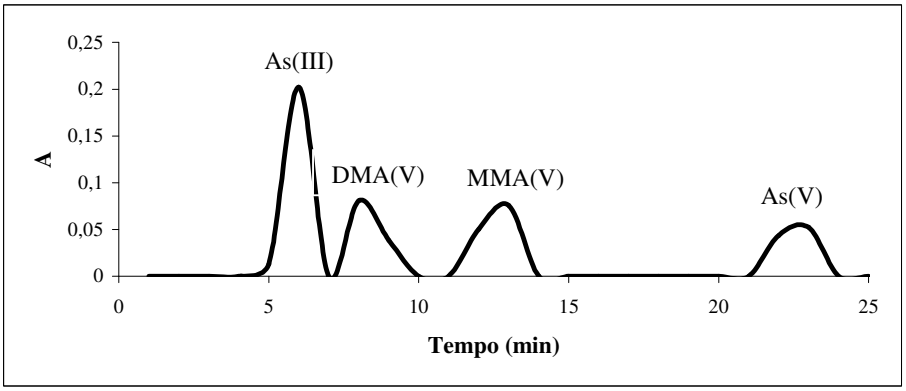


Figura 12: Cromatograma das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V))em solução de 10 mM de $NH_4H_2PO_4$ .Concentração de cada espécie de As 100 µg.L^{-1}.

O mesmo comportamento das espécies de As mostrado no cromatograma da Figura 7 ocorreu para as solução de 2 M de NH_4Cl em pH 4,0 e 6,0.

Observa-se nas Figuras 7 a 12 que o único eluente que não influenciou nos tempos de retenção de nenhuma das espécies de As foi a solução de 10 mM de $NH_4H_2PO_4$. Portanto, concluí-se, que na Figura 12 está mostrado a condição mais adequada para a análise de especiação de As contaminante das soluções de nutrição parenteral.

3.6 Investigação sobre formação de As orgânico no processo de esterilização de soluções de aminoácidos, glicose e vitaminas.

Para verificar o comportamento das espécies As ao aquecimento, submeteu-se as soluções aquosas de cada espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) ao processo de esterilização. Para isso, preparou-se separadamente soluções das espécies de As e transferiu-se metade de cada solução para frascos de vidro, tais frascos foram submetidos ao processo de esterilização (121 °C) em uma autoclave, por 30 min. Logo a seguir ajustou-se o pH das soluções, procedeu-se a etapa de "clean up" e logo a seguir a separação cromatográfica das soluções esterililizadas e não esterilizadas de cada espécie de As. Procedeu-se da mesma forma com água ultrapura do Mili-Q também submetida ao processo de esterilização (Tabelas 19, 20 e Figura 13).

Tabela 19 - Recuperação das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V), As(V)) na etapa de "clean up" antes e após a esterilização em solução aquosa.

Espécie adicionada (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		78,8	n.d	98,5
As(III)	X	79,1	n.d	98,9
DMA(V)		n.d	157,9	98,7
DMA(V)	X	n.d	159,2	99,5
MMA(V)		n.d	158,4	99,0
MMA(V)	X	n.d	156,8	98,0
As(V)		n.d	160,3	100,2
As(V)	x	n.d	159,5	99,7

-: Branco (água do Mili-Q)
n.d: não detectado

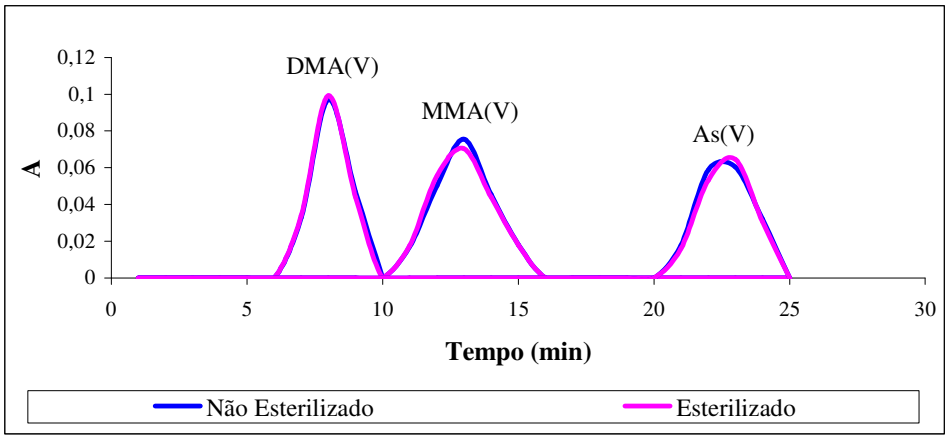


Figura 13: Cromatograma das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em solução aquosa antes e após a esterilização com estapa de "clean up". Concentração das espécies 160 µg.L^{-1}, volume de injeção de 500 µL, eluente 10 mM $NH_4H_2PO_4$ em pH 6,0.

Tabela 20 – Recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em solução esterilizada e não esterilizada após a separação cromatográfica.

Espécie de As	Esterilização	Recuperação (%)
DMA(V)		98,5
DMA(V)	X	99,1
MMA(V)		93,2
MMA(V)	X	92,2
As(V)		98,6
As(V)	X	99,5

A Tabela 19 mostra uma recuperação próxima de 100% para todas as espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) em solução aquosa, na etapa de "clean up", não diferindo as soluções esterilizadas das não esterilizadas. A Figura 13 mostra que a separação cromatográfica é bastante adequada, havendo uma recuperação satisfatória para esta etapa, e também não houve diferença entre as soluções das espécies de As esterilizadas e não esterilizadas mostrado na Tabela 20.

Estes resultados mostram que apenas o processo de esterilização não acarreta a conversão de uma espécie de As em outra, ou seja, a conversão de As inorgânico em orgânico, e vice versa, e ainda, reações de oxidação e redução.

Para observar se as substâncias constituintes das formulações comerciais de nutrição parenteral, tais como aminoácido, carboidratos e vitaminas, reagiriam com As(III) e As(V), durante o processo de esterilização, formando espécies de As orgânico (DMA(V), MMA(V)), preparou-se soluções contendo as substâncias referenciadas na Tabela 5 que foram

fortificadas separadamente com As(III) e As(V) e uma alíquota dessas soluções foram submetidas ao processo de esterilização.

As soluções, incluindo o branco de cada substância esterilizado e não esterilizado, foram submetidas ao procedimento de ajuste de pH, etapa de "clean up", separação cromatográfica e medida da concentração das espécies de As nas diferentes frações por Geração de Hidretos.

Os resultados deste estudo para cada substância estão mostrados nas Figuras 14 a 21 e nas Tabelas 21 a 28.

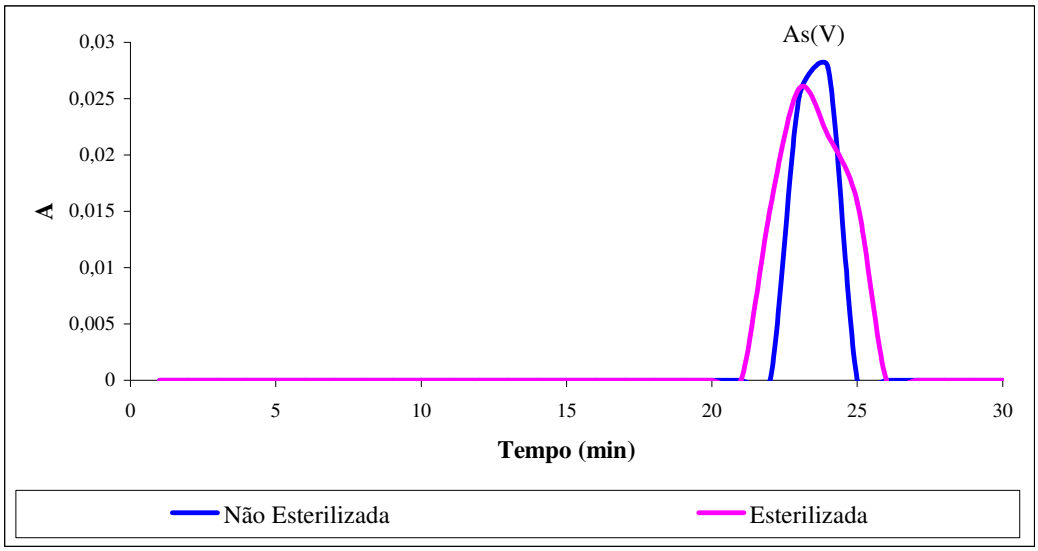


Figura 14. Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Glicina antes e após a esterilização.

Tabela 21 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Glicina após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		71,1	n.d	88,9
As(III)	X	71,8	n.d	89,7
As(V)		n.d	36,1	22,5
As(V)	X	n.d	53,2	33,2

-: Branco (solução de 0,1% de glicina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

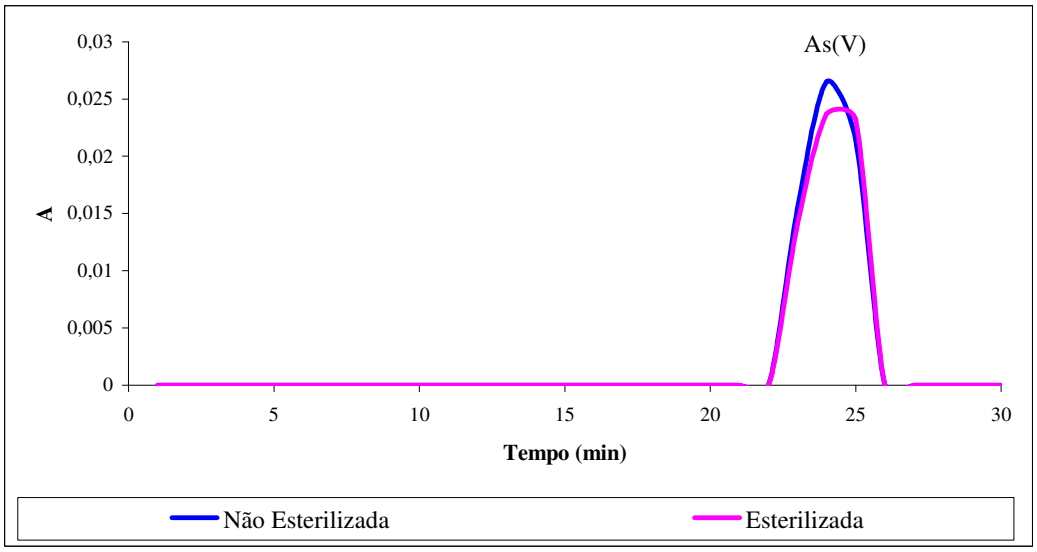


Figura 15: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Serina antes e após a esterilização

Tabela 22 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Serina após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		71,8	n.d	89,7
As(III)	X	75,1	n.d	93,9
As(V)		n.d	57,3	35,8
As(V)	X	n.d	56,7	35,4

-: Branco (solução de 0,1% de serina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

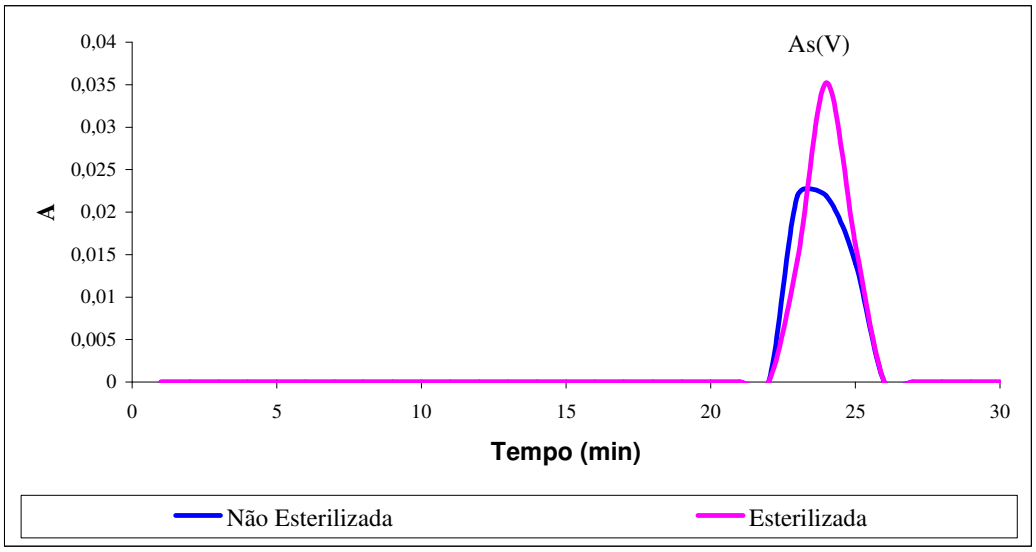


Figura 16: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Metionina antes e após a esterilização

Tabela 23 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Metionina após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		80,3	n.d	100,4
As(III)	X	80,2	n.d	100,2
As(V)		0,19	52,7	32,9
As(V)	X	0,3	58,2	36,4

-: Branco (solução de 0,1% de metionina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

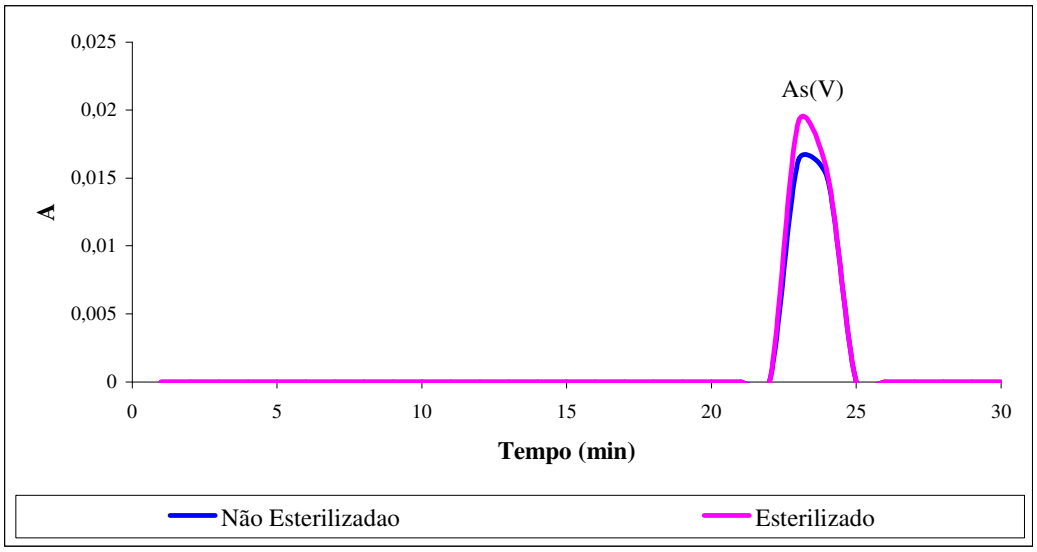


Figura 17: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Ácido Aspártico antes e após a esterilização

Tabela 24 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Ácido Aspártico após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		78,9	n.d	98,6
As(III)	X	78,5	n.d	98,1
As(V)		n.d	21,5	13,4
As(V)	X	n.d	19,0	11,9

-: Branco (solução de 0,1% de metionina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

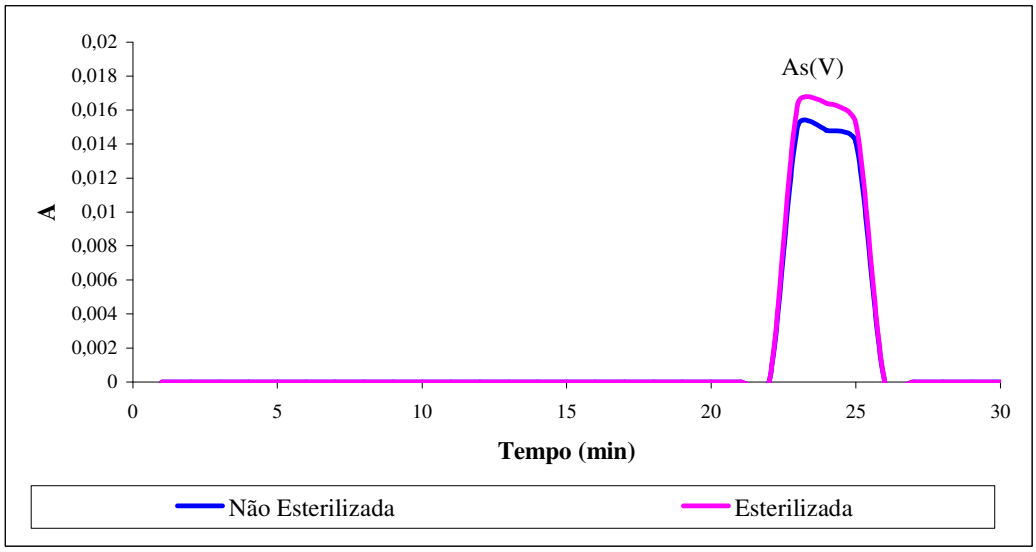


Figura 18: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Fenilalanina antes e após a esterilização.

Tabela 25 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Fenilalanina após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		80,7	n.d	100,9
As(III)	X	79,4	n.d	99,2
As(V)		n.d	7,45	4,6
As(V)	X	n.d	9,16	5,7

-: Branco (solução de 0,1% de fenilalanina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

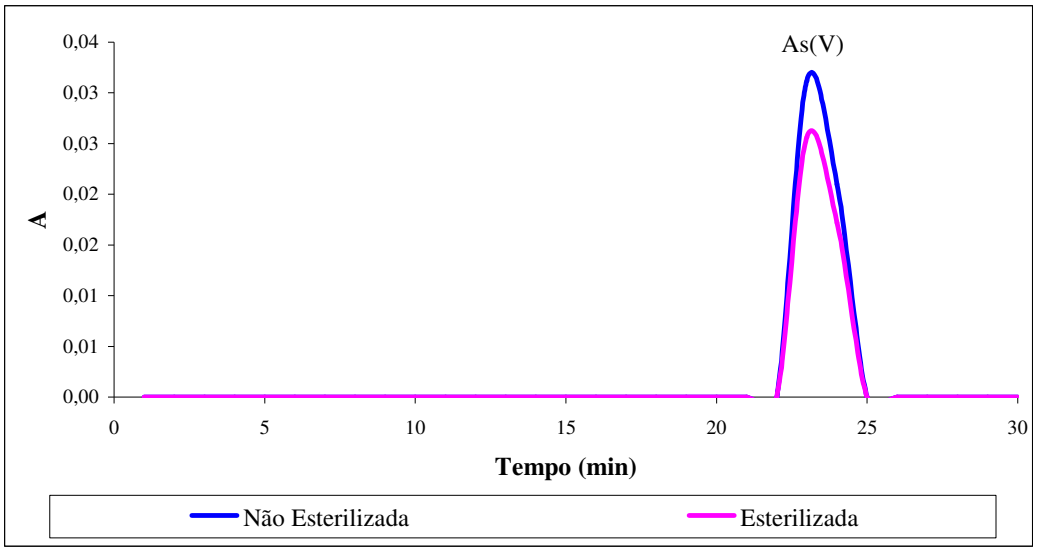


Figura 19: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Glicose antes e após a esterilização

Tabela 26 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Glicose após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		70,2	n.d	87,7
As(III)	X	71,9	n.d	89,9
As(V)		n.d	62,5	39,1
As(V)	X	n.d	46,0	28,7

-: Branco (solução de 0,1% de glicose)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

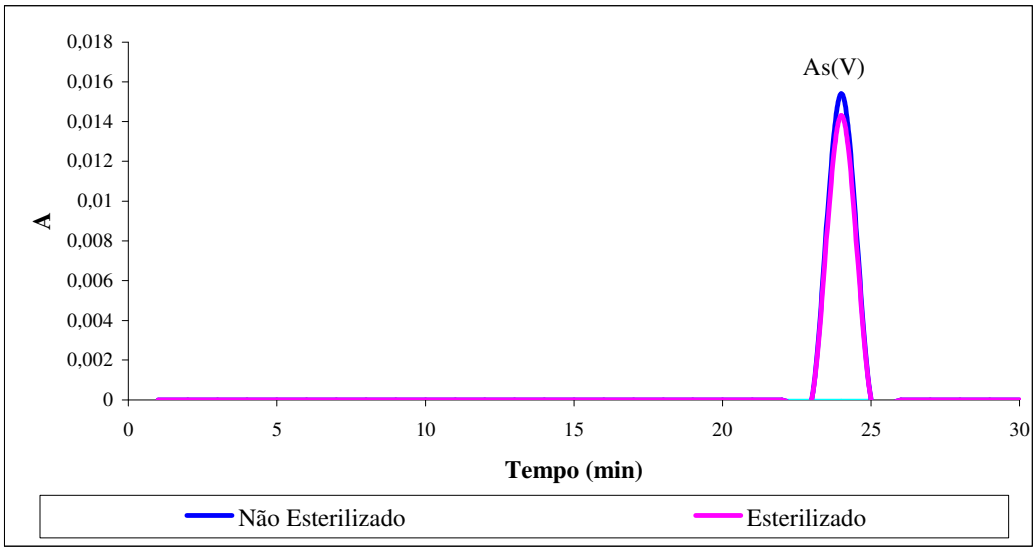


Figura 20: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Ácido Ascórbico antes e após a esterilização

Tabela 27 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Ácido Ascórbico após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		65,6	n.d	82,0
As(III)	X	73,1	n.d	91,3
As(V)		n.d	27,8	17,4
As(V)t	X	n.d	12,3	7,7

-: Branco (solução de 0,1% de ácido ascórbico)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

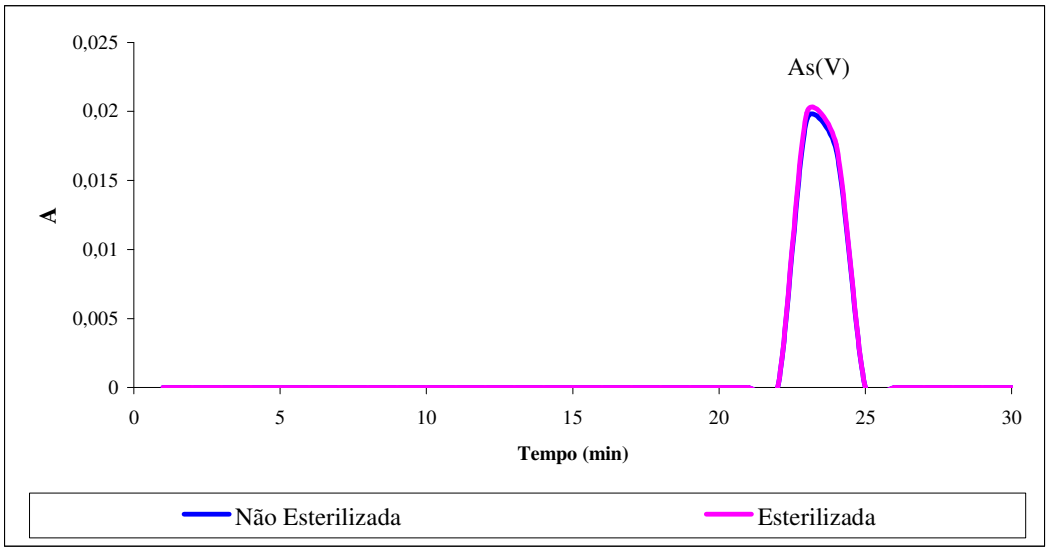


Figura 21: Cromatograma das espécies de As (80 µg.L^{-1}) em solução de 0,1% de Cianocobalamina antes e após a esterilização

Tabela 28 - Recuperação das espécies de As em solução de 0,1% de Cianocobalamina após a etapa de "clean up".

Espécie de As (80 µg.L^{-1})	Esterilização	Efluente (µg.L^{-1})	Eluato (µg.L^{-1})	Recuperação (%)
-		n.d	n.d	n.d
-	X	n.d	n.d	n.d
As(III)		68,4	n.d	85,5
As(III)	X	64,9	n.d	81,1
As(V)		n.d	49,3	30,8
As(V)	X	n.d	35,5	22,2

-: Branco (solução de 0,1% de cianocobalamina)
n.d: não detectado
obs: Há um fator de pré-concentração de 2 vezes em relação ao analito da solução e o analito do eluato

Os resultados mostram que o As(III) adicionado foi recuperado em todas as amostras investigadas tanto nas soluções esterilizadas quanto nas não esterilizadas. Isto mostra que não ocorrem reações entre o As(III) e as substâncias investigadas. Resultado diferente foi encontrado para o As(V), que apresentou baixas recuperações na presença das substâncias orgânicas, tanto nas soluções esterilizadas quanto nas não esterilizadas.

Essas baixas recuperações poderiam ser devido à formação de As orgânico, resultante da reação de metilação de As(V) com as substâncias orgânicas, mas observa-se nas Figuras 14 a 21 que não houve sinal referente às espécies de As orgânico (DMA(V) e MMA(V)). Essa

ausência de sinal poderia estar relacionada à interferência matricial que ocorreu mesmo após a etapa de "clean up", mas em menor gravidade.

Então, com o objetivo de elucidar a interferência da matriz na eluíção da etapa de "clean up", utilizou-se soluções de glicose com cada espécie de As e com a mistura dessas espécies e, coletou-se frações seguintes a 10 mL (Tabelas 29 e 30).

A glicose serviu para representar a interferência matricial observada semelhantemente em todas as substâncias com as quais foram realizados os testes acima.

Tabela 29 – Estudo da interferência da matriz (glicose 0,1%) na recuperação do As (III) no efluente da etapa de "clean up".

Espécie de As	Recuperação As(III) no efluente (%)
-	n.d
As(III) + DMA(V) + MMA(V)	106,1
As(III) +DMA(V) + MMA(V) + As(V)	104,5

-: Branco (solução de 0,1% de glicose)
n.d: não detectado

Tabela 30 - Estudo da interferência da matriz (glicose 0,1%) na eluíção das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) na etapa de "clean up".

Espécie de As	Recup. (%) 10 mL	Recup. (%) 20 mL	Recup. (%) 30 mL	Total Recup. (%)
-	n.d	n.d	n.d	n.d
As(V)	44,2	34,1	15,4	93,7
MMA(V)	78,0	16,7	2,5	97,2
DMA(V)	82,3	9,2	0,9	92,4
As(V) + MMA(V) + DMA(V)	61,8	14,5	5,3	81,6
As(III) + DMA(V) + MMA(V)	88,7	13,4	-	102,1
As(III) +DMA(V) + MMA(V) + As(V)	65,1	7,6	2,9	75,6

-: Branco (solução de 0,1% de glicose)
n.d: não detectado

Com o estudo cujos resultados estão mostrados nas Tabelas 29 e 30 pode-se concluir que a interferência da matriz ocorreu na etapa de "clean up" apenas para o As(V), sendo necessário um volume total de 30 mL do eluente para se conseguir uma recuperação de 93,7% de As (V).

As amostras não impedem a adsorção das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) na resina, mas reduzem a capacidade do eluente em retirá-las, ou ainda, promovem

uma desorção mais intensa , por isso a necessidade de um volume maior de eluente para que haja a retirada dessas espécies.

Para As(III), DMA(V) e MMA(V), a interferência não foi significante, pois suas recuperações foram satisfatórias na fração de 10 mL.

Portanto, se houvesse a formação de As orgânico (DMA(V) e MMA(V)), resultante da reação de metilação do As(V) com as substâncias orgânicas, esses seriam eluatos na etapa de "clean up" na primeira fração, de 10 mL, e seus sinais apareceriam nos cromatogramas.

3.7 Ensaios de Recuperação das espécies de As nas amostras comerciais

A recuperação das espécies de As foi realizada com o objetivo de avaliar a interferência da matriz na determinação das espécies, pelo método proposto (Tabelas 31 e 32).

Para avaliar a presença das diferentes espécies de As nas soluções comerciais para as formulações das nutrições parenterais, foram escolhidas amostras comerciais contendo aminoácidos, carboidratos e vitaminas, a fim de abranger a maioria dos constituintes destas soluções.

Para este fim, utilizou-se as amostras comerciais, descritas na Tabela 6 e 7, diluídas 100 vezes, pois a grande concentração de constituintes interferiria no método,. As soluções foram fortificadas por 50 $\mu g.L^{-1}$ de cada espécie de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) e submeteu-as ao método proposto.

Tabela 31 - Recuperação de 50 $\mu g.L^{-1}$ de As(III) no efluente da etapa de "clean up".

Amostra	Recuperação As(III) no efluente (%)
Citoneurin	70,6
Nefroamino AEH	74,6
AminosteriL HEPA 8%	104,0
Frutovena	79,2
Aminoped 10%	85,8
Aminoplasmal L 10 A	102,0
Vitamina C	89,2

Tabela 32 - Recuperação de 50 µg.L^{-1} de cada espécie de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) eluídas com 10, 20 e 30 mL de $(NH_4)H_2PO_4$ na etapa de "clean up".

Amostra	Recup.(10 mL) (%)	Recup.(20 mL) (%)	Recup. (30 mL) (%)	Total (%)
Citoneurin	34,9	28,5	27,8	91,2
Nefroamino AEH	47,8	23,8	23,0	94,6
AminosteriL HEPA 8%	48,7	26,5	21,5	96,7
Frutovena	40,7	38,9	16,6	96,2
Aminoped 10%	50,2	33,4	13,8	97,4
Aminoplasmal L 10 A	55,8	32,4	10,1	98,3
Vitamina C	70,0	21,4	8,4	99,8

A Tabela 31 mostra boas recuperações para As(III), recolhido no efluente, na presença das amostras comerciais, bem como mostrado na Tabela 32 uma recuperação satisfatória para as outras espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) dessorvidas na etapa de "clean up" por um volume total de 30 mL de eluente.

Este eluato foi injetado no sistema cromatográfico para a devida separação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), mostrados nas Figuras 22 a 28, as recuperações dessas espécies de As medidas por HG-AAS nas frações coletadas no sistema cromatográfco estão descritas nas Tabelas 33 a 39.

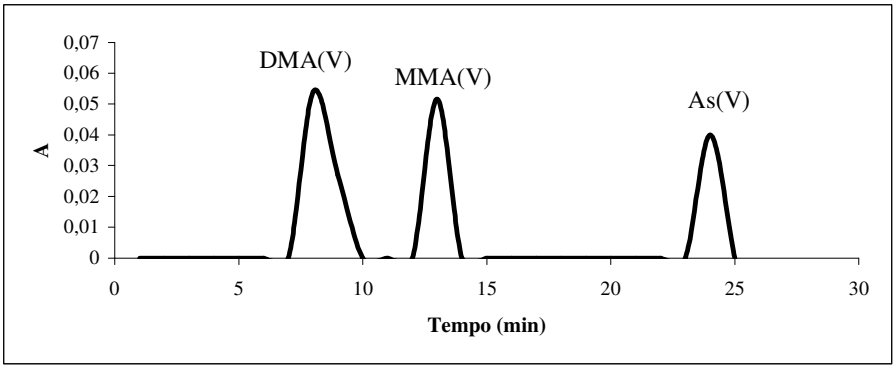


Figura 22: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Citoneurin.

Tabela 33 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Citoneurin, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	103,6
MMA(V)	83,4
As(V)	86,6

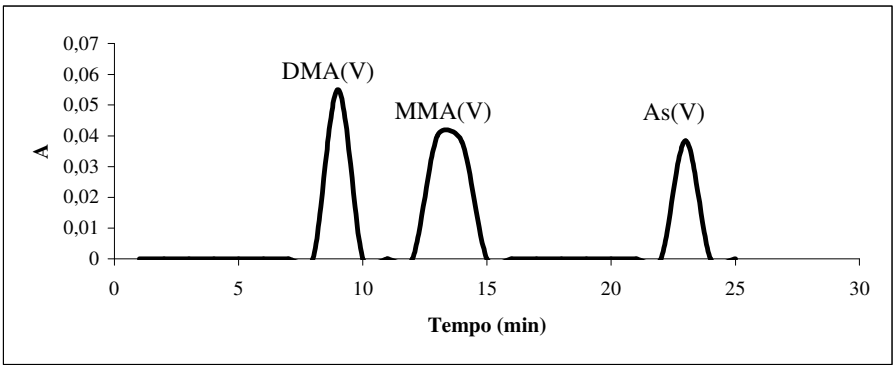


Figura 23: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Nefroamino AEH.

Tabela 34 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Nefroamino AEH, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	94,0
MMA(V)	105,6
As(V)	84,2

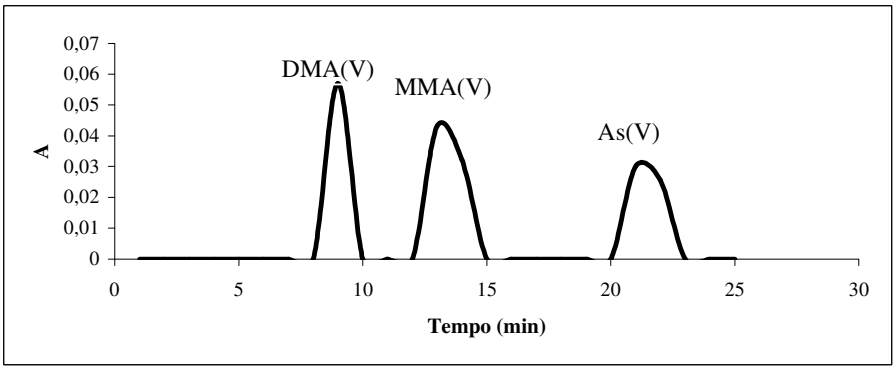


Figura 24: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminosteril HEPA 8%.

Tabela 35 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Aminosteril HEPA 8%, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	99,4
MMA(V)	101,6
As(V)	89,0

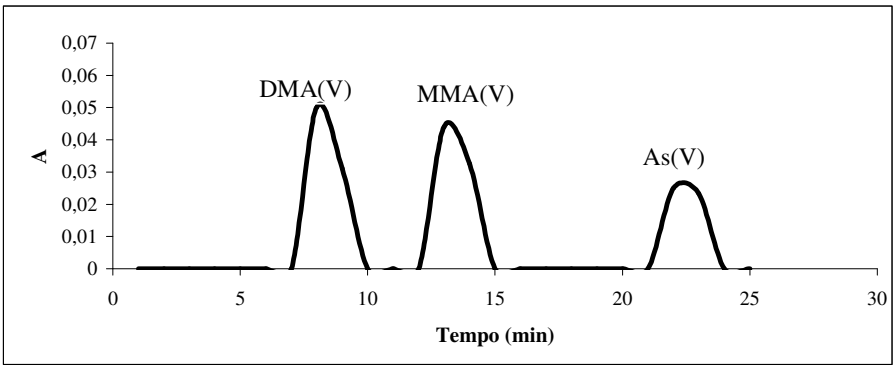


Figura 25: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Frutovena.

Tabela 36 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Frutovena, são separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	97,2
MMA(V)	104,4
As(V)	86,8

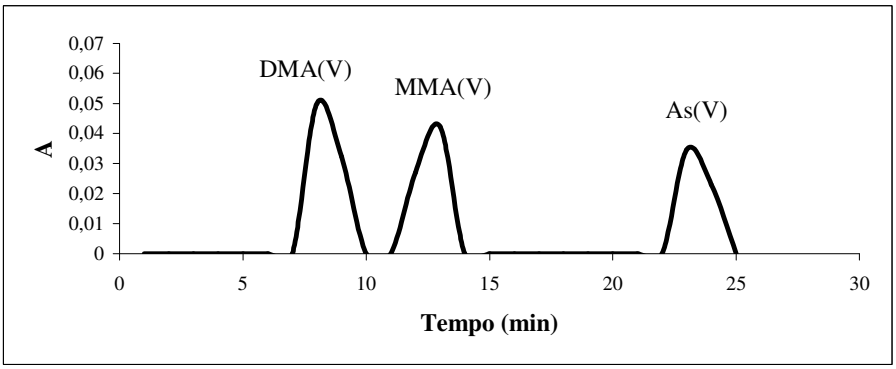


Figura 26: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminoped 10%.

Tabela 37 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), em solução de Aminoped 10%, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	106,0
MMA(V)	86,6
As(V)	99,6

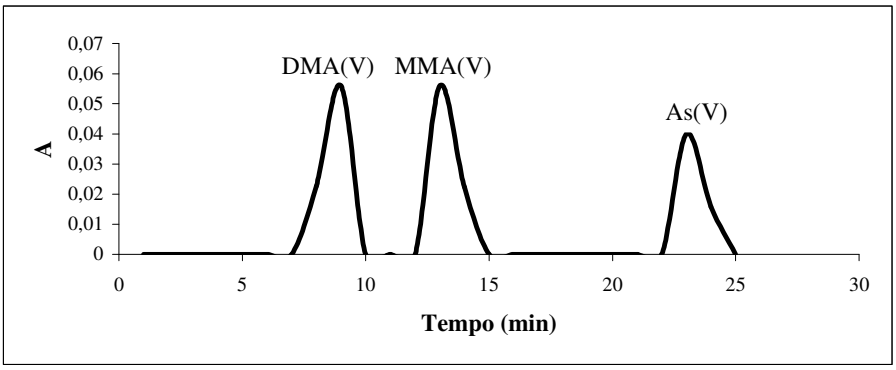


Figura 27: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Aminoplasmal L 10 A.

Tabela 38 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)), solução de Aminoplasmal L 10 A, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	98,6
MMA(V)	102,6
As(V)	93,6

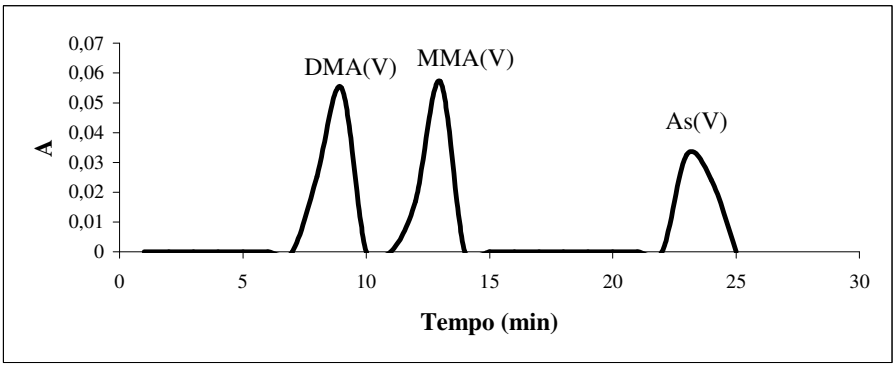


Figura 28: Cromatograma do ensaio de recuperação das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em Solução de Ácido Ascórbico.

Tabela 39 – Recuperação de 50 µg.L^{-1} das três espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)),em solução de Ácido Ascórbico, separadas no sistema cromatográfico.

Espécie de As	Recuperação (%)
DMA(V)	102,8
MMA(V)	99,0
As(V)	97,6

Apesar destas amostras possuírem uma grande variedade de constituinte, conseguiu-se boas recuperações na eluíção na etapa de "clean up", assim como, na separação cromatográfica.

3.7 Determinação das espécies de As nas soluções comerciais

Soluções comerciais que são usadas nas soluções de nutrição parenteral foram analisadas pelo método proposto, a fim de determinar a concentração e as espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)). Analisou-se pelo menos uma amostras de cada grupo de constituintes das soluções de nutrição parental, tal como carboidratos, aminoácidos e vitaminas. Nas Tabelas 6 e7 estão descritas as formulações de cada solução empregada no presente trabalho.

Averiguou-se a concentração total de As contida nos constituintes das formulações parenteral (Tabela 40), esta medida foi realizada diretamente por HG-AAS.

Tabela 40 - Concentração total de As nas amostras comerciais

Amostra	Concentração Total de As ($\mu g.L^{-1}$)
Citoneurin	1,83
Vitamina C	3,66
Aminoped 10%	2,68
Nefroamio AEH	3,20
Aminoplasmal L 10 A	1,87
Aminosteril HEPA 8%	3,43
Frutovena	2,87

As concentrações de As total nas amostras comerciais, mostrados na Tabela 40, são muito baixas, além disso, é necessária realizar uma diluição de 100 vezes devido a grande quantidade de constituintes que geram uma interferência matricial, por isso o teor de nenhuma das espécies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)) nestas amostras foi detectada.

4 CONCLUSÃO

A possível formação de arsênio orgânico (DMA e MMA), devido à reação de metilação dos arsênios inorgânicos com os constituintes orgânicos das soluções comerciais durante o aquecimento para o processo de esterilização foi investigada.

O estudo mostrou que não há a conversão de arsênio inorgânico (As(III) e As(V)) em arsênio orgânico (DMA(V) e MMA(V)) sob as condições utilizadas (vapor úmido à 121°C por 30 minutos), e na presença de glicose, aminoácidos e vitaminas.

Para esta investigação foi necessária uma análise de especiação. A separação das espécies de arsênio foi feita por cromatografia iônica, em que se coletou frações referentes aos tempos de retenção de cada espécie de As (DMA(V), MMA (V) e As(V)). A determinação da concentração dessas espécies de As foi feita por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.

Devido à natureza complexa e à elevada concentração dos constituintes das matrizes a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico não foi possível, portanto, uma etapa prévia de "clean up" por adsorção das espécies de As (DMA(V), MMA(V) e As(V)) em uma resina trocadora de ânions foi necessária para a conclusão satisfatória da análise de especiação. O As(III) não ficou retido na resina trocadora de ânions devido ao pH escolhido, sendo este recolhido no efluente da etapa de "clean up", e as demais espécies são eluídas simultaneamente da coluna e separadas no sistema cromatográfico.

Pode-se concluir que se há a formação de arsênio orgânico (DMA(V) e MMA(V)), as concentrações são muito baixas, sendo menores que os limites permitidos pelo método de HGAAS.

A especiação do As em soluções de nutrição parenteral ainda merece estudos mais profundos, pois mesmo que os teores de formação de arsênio orgânico (DMA(V) e MMA(V)) sejam baixos ou até inexistentes, ainda há possibilidade de formação de outras espécies de As orgânico, tais como arsenocolina, arsenobetaína, óxido trimetil asênico e íon tetrametilarsônio.

Entretanto, se realmente não ocorre nenhuma formação de espécies de As orgânico, modificando, assim, a composição dos medicamentos devido a reações de seus constituintes com espécies de arsênio inorgânico, os fabricantes devem ter muita atenção para o armazenamento em embalagens de vidro, pois, ainda existe a grave contaminação por arsênio inorgânico que coloca em risco pacientes que necessitam de tais medicamentos.

5 APÊNDICES

5.1 Apêndice 1 - Reagentes utilizados

Reagente	Grau de pureza	Fabricante
Ácido aspártico	p.a	Aldrich
Ácido Ascórbico	p.a	Vetec
Ácido clorídrico	p.a	Merck
Borohidreto de sódio	p.a	Merck
Cianocobalamina	comercial	Farmácia Dermapele
Cloreto de amônio	p.a	Merck
Dihidrogenofosfato de amônio	p.a	Merck
Dimetilarsenato de sódio	p.a	Àcros Biogen
Fenilalanina	p.a	Vetec
Glicina	p.a	Vetec
Glicose	p.a	Belga
Hidróxido de amônio	p.a	Merck
Hidróxido de sódio	p.a	Merck
Metionina	p.a	Merck
Meta arsenato de sódio	p.a.	Synth
Mometilarsenato de hidrogênio e sódio	p.a	Chem Service
Serina	p.a	Vetec
Trióxido de arsênio	p.a	Merck

5.2 Apêndice 2 – Condições utilizadas na etapa de "clean up"

Resina: Aniônica fortemete básica IRA-410

Massa de resina utilizada: 1 g

Faixa pH da solução de As para a retenção: 7,0 a 8,0

Vazão para retenção: 0,3 $mL.min^{-1}$

Espécies de As retidos na resina: DMA(V), MMA(V) e As(V)

Eluente: 10 mM de $NH_4H_2PO_4$

Vazão para dessorção: 1 $mL.min^{-1}$

5.3 Apendice 3 – Condições utilizadas para Cromatogragia Líquida de Alta Eficiência

Coluna: Hamilton PRP-X100 (10 µm, 250 mm x 4,1 mm)

Fase móvel: 10 mM de $NH_4H_2PO_4$ em pH 6,0

Volume de injeção: 500 µL

Programa de vazão: 0,6 $mL.min^{-1}$ até 13 min e 1,5 $ml.min^{-1}$ até 25 min

Frações coletadas: 7 a 10; 11 a 15 e 20 a 25 minutos.

5.4 Apendice 4 – Condições utilizadas na Espectrometria de Absorção Atômica - Geração de Hidretos

Elemento: As

Comprimento de onda: 193,7 nm

Fenda: 0,5 nm

Corrente da lâmpada: 7,0 mA

Tipo de aquecimento: eletrotérmico

Temperatura de aquecimento do atomizador: 925^0 C

Fluxo N_2: 1,5 L/min

Tempo de pré-integração: 30 s

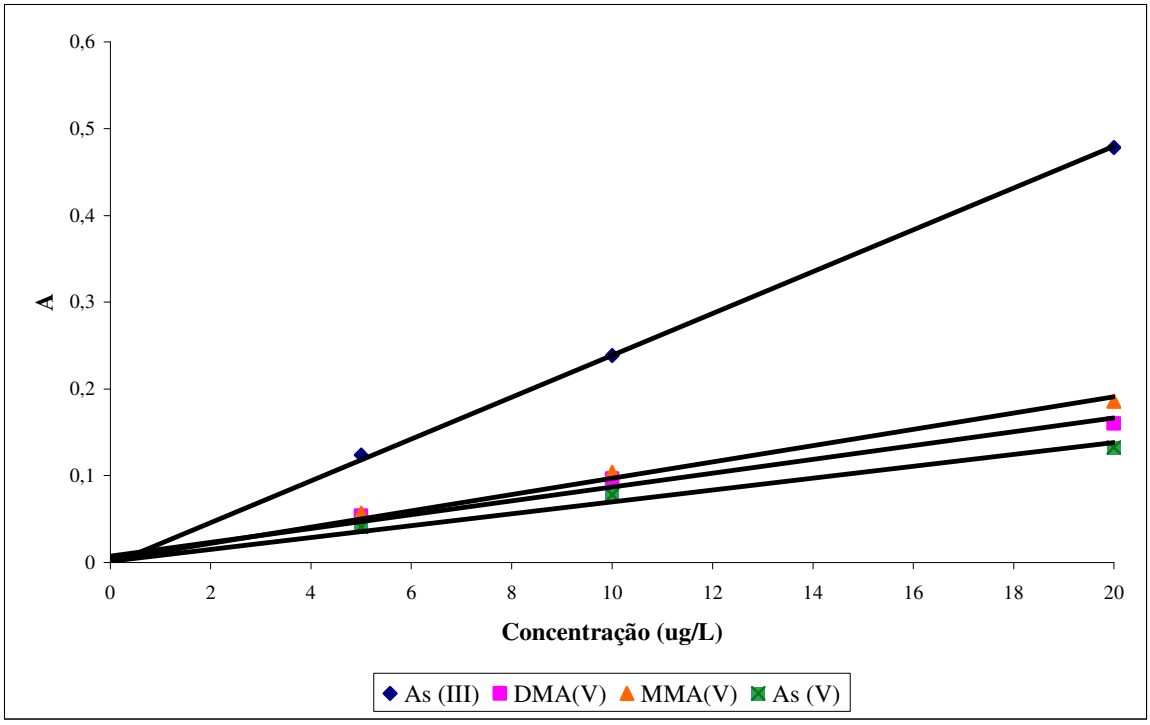
Tempo de integração: 3 x 5 s

Parâmetros das condições de especiação para determinação de As(III), DMA(V), MMA(V) e As(V)

Fluxo HCl 6 mol.L^{-1}: 1 mL/min

Fluxo de $NaBH_4$ 1% (m/v): 1 mL/min

Fluxo de amostra: 8 mL/min



Espécie de As	Equação da Reta	R^2
As(III)	Y= 0,0237X + 0,0042	0,9999
DMA(V)	Y= 0,0070X + 0,0221	0,9940
MMA(V)	Y= 0,0085X + 0,0161	0,9988
As(V)	Y=0,0060X + 0,0138	0,9940

6 BIBLIGRAFIA

1- **PIZARRO, I., GÓMEZ, M., CÁMARA, C., PALACIOS, M. A.,** *Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies,* Analytica Chimica Acta, 495, 85-98, 2003.

2- **LOFFREDO, C. A., APOSHIAN, H. V., CEBRIAN, M. E., YAMAUCHI, H., SILBERGELD, E. K.,** *Variability in human metabolism of arsenic,* Environmental Research, 92, 85-91, 2003.

3- **NASCIMENTO, P.C. do, BOHRER, D., BECKER, E., CARVALHO, L. M. de,** C*omparison of different samples treatments for arsenic speciation in glass samples*, Journal Non-Crystalline Solids, 351, 1312-1316, 2005.

4- **BOHRER, D., NASCIMENTO, P. C., BECKER, E., CARVALHO, L. M de, DESSUY, M.,** *Arsenic species in solutions for parenteral nutrition*, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 29 (1),2005.

5- **FISCHER, J. E.** *Nutrição Parenteral.* Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.

6- **HARRAKI, B. GUIRAUD, P. ROCHAT, M. H. ALARY, J. FAVIER,** A. *Interactions related to trace elements in parenteral nutrition*, Pharmaceutica Acta Helvetiae, 70: 269-278, 1995.

7- **PLUHATOR-MURTON, M. M. FEDORAK, R. N. AUDETTE, R. J. MARRIAGE, B. J. YATSCOFF, R. W. GRAMLICH, L., M.,** *Trace elemente contamination of total parenteral nutrition. 1.Contribution of component solutions.* J. Parenter. Enteral Nutr, 23(4): 222-7, 1999.

8- **PLUHATOR-MURTON, M. M. FEDORAK, R. N. AUDETTE, R. J. MARRIAGE, B. J. YATSCOFF, R. W. GRAMLICH, L. M.,** *Trace elemente contamination of total parenteral nutrition. 2 Effect of storage duration and temperature*. J. Parenter. Enteral Nutr, 23(4): 228-232, 1999.

9- **CHAPPUIS, P. ARNAUD, J. JAUDON, M. C. ZAWISLAK, R. BELLANGER, J.,** *Concentration of zinc, copper, selenium and aluminum in parenteral nutritive solutions.* Annales de Biologie Clinique, 49(8): 421-7, 1991.

10- **LEUNG, F. Y.**, *Trace elements in parenteral micronutrition.* Clinical Biochemistry, 28(6): 561-6, 1995.

11- **AVIS, K. E. LACHMAN, L. LIERBMAN, H. A.**, *Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications*, Vol. 2, Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1986.

12- **ALVES, O. L., GIMENEZ, I. de F., MAZALI, I. O.,** *Vidros,* Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, Ed. Especial, 13-24, Maio de 2001.

13- **FARMACOPÉIA AMERICANA**, *United States Pharmacopeia (USP),* 23p. 1781.

14- **FARMACOPÉIA BRITÂNICA**, *British Pharmacopeia*, A 200, 1993.

15- **LEE, J. D.,** *Química Inorgânica não tão concise,* 5ª Ed., Ed.Edfard Blücher LTDA, São Paulo, 1999.

16- **KRÄMER, F. W.** *Analysis and interpretation of gas bubbles*, www.schottglas.de

17- **SHELBY, J.E.** *Introduction to Glass Science and Technology*, The Royal Society of chemistry, USA, 1997.

18- **KRÄMER, F. W,** *Solubility of gases in glass melts*, www.schottglas.de

19- **HAYASHI, T. DORFELD, W. G.,** *Eletrochemical study of* As^{+3}/As^{+5} *equilibrium in a barium borosilicate glass melt*, J. Non-Cristaline Solids, 177: 331-339, 1994.

20- **ILLIG, H.J.;** *ABC Glas, Duetscher Verlag für Grundstoffindustie*, Leipzig, 1983.

21- **OHLWEILER, O. A.,** *Química Inorgânica*, Vol. 1, Editora Edgar Blücher, São Paulo, 1971.

22- **CAROLI, S.,** *Element speciation in bioinorganic chemistry*, John Wiley and Sons, USA, 1996.

23- **KLAASSEN, C. CASARETT AND DOULL'S.,** *Toxicology – The Basic Science of Poisons*, 5ª Ed., USA, 1996.

24- **MERIAN, E.,** *Metals and their compounds in the environment occurrence, analysis and biological relevance*, Germany, 1991.

25- **JAIN, C. K., ALI, I.,** *Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques,* Pergamon, 34 (17), 4304-4312, 2000.

26- **FLAHHERTY, E. J**., *Physiologically Based Models of Metal Kinetics*, Critical Reviews in Toxicology, 28 (3), 271-317, 1998.

27- **HUGHES, M., F.,** *Arsenic toxicity and potential mechanisms of action,* Toxicology Letters, 133, 1-16, 2002.

28- **SUZUKI, T. K., MANDAL, B.K., OGRA, Y.,** *Speciation of arsenic in body fluids,* Talanta, 58, 111-119, 2002.

29- **BARRA, M. C., SANTELLI, R., E., ABRÃO, J. J., GUARDIA, M. de la,** *Especiação de arsênio – uma revisão*, Química Nova, 23, (1), 58-70, 2000.

30- **PACEY, G. E., FORD, J.A.,** *Arsenic speciation by ion-exchange separation and graphite-furnace atomic- absorption spectrophotometry,* Talanta, 28,935-938, 1981.

31- **POHL, P., PRUSISZ, B.**, *Ion column chromatography - an attempt to speciate arsenic,* Trends in Analytical Chemistry, 23 (1): 63-69, 2004.

32- **CARRERO, P., MALAVÉ, A., BURGGUERA, J. L., BURGUERA, M., RONDÓN, C.,** *Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation of the effects of the acid concentration of different reaction media o the generation of arsines,* Anlytica Chimica Acta, 438, 195-204, 2001

33- **HYMER, C. B., CARUSO, J.A.,** *Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry,* Journal of Chromatography A, 1045, 1-13, 2004.

34- **BORTOLETO, G. G., CADORE, S.**, *Determination of total inorganic in water using on-line pre-concentration and hydride-generation atomic absorption spectrometry*, Talanta 67, 169-174, 2005

35- **VOGEL, A.**; *Análise Química Quantitativa*, 5ª Ed., Ed. Mestre Jou, São Paulo, 1992.

36- **HARRIS, D. C.;** *Quantitative Chemical Analysis*, 5ª Ed. W.H. Freeman and Company, USA, 1998.

37- **LEERMAKERS, M., BAEYENS, W., DE GIETER, M., SMEDTS, B., MEERT, C., DE BISSCHOP, H. C., MORABITO, R., QUEVAUVILLER, P. H.,** *Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and Validation,* Trends in Analytical chemistry, 25 (1):1-10, 2006

38- **BECKER, E.**; *Investigação sobre a origem da contaminação pelas espécies de arsênio em soluções de nutrição parenteral*, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2002.

39- **DEVESA, V., MACHO, M. L., JALÓN, M., URIETA, I., MUÑOZ, O., SÚÑER, M. A., LÓPEZ, F., VÉLEZ, D., MONTORO, R.,** *Arsenic in cooked seafood products: study on effect of cooking on total and inorganic arsenic contents,* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4132-4140, 2001.

40- **ELETREN, J. T. VAN, SLEJKOVEC, Z.,** *Ion-exchange separation of eight arsenic compounds by hight-performance liquid chromatography – UV decomposition–hydride generation-atomic fluorescence spectrometry and stability tests for food treatment procedures,* Journal of Chromatography A, 789, 339-348, 1997.

41- **DEVESA, V., MARTINÈZ, A., SÚÑER, M. A., BEITO, V., VÉLEZ, D., MONTORO, R.,** *Kinetic study of transformation of arsenic species during heat treatment,* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2267-2271, 2001.

42- **HAMILTON, Precision fluid measuring products catalog.**

43- **LE, X. C., CULLEN, W. R., REIMER, K. J.,** *Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absoption spectrometry,* Analytica Chimica Acta, 285, 277-285, 1994.

44- **GUO, T., BAASNER, J., TSALEV, D. L.,** *Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry,* Analytica Chimica Acta, 349, 313-318, 1997.

45- **SHRAIM, A., CHISWELL, B., OLSZOWY, H.,** *Speciation of arsenic by hydride generation – atomic absorption spectrometry (HG-AAS) in hydrochloric acid reaction medium,* Talanta, 50, 1109-1127, 1999.

46- **TORRALBA, A. L., PALACIOS, M. A., CAMARA, C.,** *Generation of AsH_3 from As(V) in the absence of KI as prereducing agent: speciation of inorganic arsenic,* Talanta, 39 (10): 1343-1348, 1992.

47- **WELZ, B., MELCHER, M.,** *Mechanisms of transition metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry, Part 2: Influence of valency state of arsenic on the degree of signal depression caused by copper, iron and nickel,* Analyst, 109, 573-574, 1984.

48- **BRINDLE, I.D., LÊ, X. C. and LI, X.F., J.,** Anal. At. Spectrom., 4, 227,1989.

49- **TSALEV, D. L., SPERLING, M., WELZ, B.,** *Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric study of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsonate and dimethylarsinate and hight-performance liquid chromatography separation of their L-cysteíne complexes,* Talanta, 51, 1059-1068, 2000.

50- **NASCIMENTO, P. C. DO, ROHLFES, A. L. B., BOHRER, D., CARVALHO, L. M. DE, PILAU, E. J.,** *HPLC based method using sample precolumm cleanup for the determination of triazines and thiolcarbamates in hemodialysis saline solutions,* Talanta 65, 211-216, 2005.

51- **BOHRER, D., NASCIMENTO, P. C. DO, MEDONÇA, J. K. A.,** *On-line deproteinization by absorption of proteins on a polyethylene powder pré-columm for determination of Na, K, Mg and Ca in human serum by hight-performance liquid chromatography,* Journal of Chromatography B, 750, 61-69, 2001.