



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ERALDO LUIZ LEHMANN

**AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA FI-HG-MF-AAS E EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR MICRO-ONDA NA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO
INORGÂNICO**

**DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**ORIENTADOR: MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA
CO-ORIENTADOR: ANNE-HÉLÈNE FOSTIER**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR ERALDO LUIZ LEHMANN, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

L528a Lehmann, Eraldo Luiz (1981-).
Avaliação de um sistema FI-HG-MF-AAS e extração assistida por micro-onda na especiação de arsênio inorgânico / Eraldo Luiz Lehmann. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.
Coorientador: Anne-Hélène Fostier.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Geração de hidretos. 2. Arsênio. 3. Especiação química. 4. Extração assistida por micro-onda.
I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Fostier, Anne-Hélène.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of a FI-HG-MF-AAS system and microwave-assisted extraction on inorganic arsenic speciation

Palavras-chave em inglês:

Hydride generation

Arsenic

Chemical speciation

Microwave-assisted extraction

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]

Nivia Maria Melo Coelho

Lauro Tatsuo Kubota

Data de defesa: 24/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Sir Isaac Newton

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.”

Madame Marie Sklodowska-Curie

“O pensamento lógico pode levar você de A a B, mas a imaginação te leva a qualquer parte do Universo.”

Albert Einstein

“O tempo é o melhor autor. Sempre encontra um final perfeito.”

Charles Chaplin

*Dedico essa dissertação á minha
mãe Marina, que sempre me
incentivou a estudar e batalhar pelos
meus sonhos.*

Agradecimentos

Inicialmente à minha família: meus pais Eraldo e Marina (*in memoriam*), meus irmãos Sylvio e Simone, minha cunhada Fabiana e meus sobrinhos Gustavo e Amanda, por estarem sempre comigo me apoiando.

Aos meus grandes amigos Bruno, Gabriel, Gustavo, Heitor, Humberto e Lucas, meus irmão de Unicamp, pelos grandes conselhos e pela amizade que me deram nas horas mais difíceis.

Aos saudosos amigos da graduação Francisco, Gustavo, Heber, Júlio, Leila, Marcos, Mariana, Nelly e Paula, pelas divertidas horas de descontração durante a longa jornada até o diploma.

Aos amigos do GEPAM, tanto os que ainda estão lá: Alessandra Vieira, Bruna, Cícero, Daiane, Elidiane, Fabiana, Gustavo (e Lívia), Herbert (e família), Ivanilce, Javier, José, Juan, Kelly, Lidiane, Marcelo, Odilon e Rodrigo; quantos aos que já saíram: Adilson, Alessandra Sussulini, Alessandra Melo, Aline Klassen (e Roberto, a esses dois um agradecimento muito especial), Aline Lopes, Ana Cristi, Cristiana, Eduardo, Geraldo, Heloisa, Jerusa, Marcel, pela agradável convivência dentro e fora do laboratório.

A todos os meus colegas funcionários do Instituto de Química, em especial aos dos Laboratórios de Ensino: Ana Paula, Beth, Daniel, Divino, Luiz Renato, Michelle, Micheli, Mirian, Nelson, Rinaldo, Rosinha, Thalita e Vanilda; e à Claudia Martelli, pela convivência diária. Também ao José Paz Jara, o desertor.

À Unicamp e ao Instituto de Química, pelas oportunidades, tanto de estudos quanto de emprego.

A todos os professores do Instituto de Química, que colaboraram direta ou indiretamente com minha formação.

Aos professores da Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado” (ETECAP), que iniciaram meu aprendizado e formação em química, nível técnico, em especial a Profa. Valquíria Terribile, professora de Química Analítica Quantitativa e Instrumental.

Aos Prof. Marco e Anne, pela orientação e paciência que tiveram comigo durante essa dissertação.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro.

Por fim, a Deus, por estar sempre iluminando meu caminho.

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Eraldo Luiz Lehmann

Brasileiro, Natural de Araras – SP, 07/03/1981.

e-mail: eraldoluiz@gmail.com

Formação Acadêmica

- 03/2008 – 02/2012 Mestrado em Química Analítica
Universidade estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP,
Brasil.
- 03/2001 – 12/2007 Bacharelado em Química – Modalidade tecnológica
Universidade estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP,
Brasil.
- 02/1996 – 12/1998 Técnico em Química
Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado” – ETECAP,
Campinas – SP, Brasil.

Produção científica

Artigos Publicados

**Lehmann, E. L., Sabadini, E., *Roto-Vibrational Spectroscopy: A Hint for DCI Generation.*
Journal of Chemical Education, 87, p. 1402-1402, **2010.****

Farinella, N. V., Matos, G. D, Lehmann, E. L., Arruda, M. A.Z., *Grape bagasse as an alternative natural adsorbent of cadmium and lead for effluent treatment;* Journal of Hazardous Materials, 154, pág. 1007-1012, **2008.**

Trabalhos Apresentados em eventos

Eraldo Luiz Lehmann, Anne-Hélène Fostier, Marco Aurélio Zezzi Arruda, *Importância da utilização de condições brandas na análise de especiação de arsênio empregando a técnica MF-HG-AAS*, 2º EspeQBrasil 2010, São Pedro-SP.

Eraldo Luiz Lehmann, Anne-Hélène Fostier, Marco Aurélio Zezzi Arruda, *Especiação de arsênio inorgânico utilizando atomizador metálico na geração de hidreto acoplado a um espectrômetro de absorção atômica com chama*, 15º ENQA 2009. Salvador-BA.

Eraldo Luiz Lehmann, Geraldo Domingues Matos, Marco Aurélio Zezzi Arruda, *Remoção de Cr(VI) de efluentes aquosos utilizando bagaço de uva*. 30ª Reunião anual da SBQ 2007, Águas de Lindóia-SP.

Eraldo Luiz Lehmann, Geraldo Domingues Matos, Marco Aurélio Zezzi Arruda, *Avaliação do Bagaço de Uva como Material Adsorvente de Cobalto*. XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp - PIBIC 2006.

Organização de Eventos

1º Encontro Brasileiro sobre Especiação Química – E speQBrasil 2008 – São Pedro – SP

2º Encontro Brasileiro sobre Especiação Química – E speQBrasil 2010 – São Pedro - SP

Resumo

Avaliação de um sistema FI-HG-MF-AAS e extração assistida por micro-onda na especiação de arsênio inorgânico

Autor: Eraldo Luiz Lehmann

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Co-orientadora: Profa. Dra. Anne-Hélène Fostier

Nessa Dissertação foram avaliados um sistema de injeção em fluxo com geração de hidretos acoplado a um espectrômetro de absorção atômica com atomizador forno metálico de liga Inconel 600® (FI-HG-MF-AAS), bem como a técnica de extração assistida por micro-onda (MAE) como método de preparo de amostra para a especiação de arsênio inorgânico.

Para o sistema FI-HG-MF-AAS, condições brandas (pH tamponado em 4,5 e concentração de tetraidridoborato(1-) 0,1% (m/v)) foram utilizadas para que apenas a espécie $As_i(III)$ gerasse o seu respectivo hidreto (arsano – AsH_3), atingindo-se limites de detecção de $2,0 \mu g L^{-1}$ e quantificação de $6,6 \mu g L^{-1}$, tornando o método adequado para uso em análises que atendam a portaria de potabilidade de água de acordo com o Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde (WHO). O $As_i(V)$ não apresentou qualquer sinal nas condições brandas, e apenas o uso de L-cisteína como pré-redutor foi eficiente para sua conversão a $As_i(III)$. O teste de recuperação foi realizado utilizando material de referência NIST 1643e, Traços de elementos em água, com $60,45 \mu g L^{-1}$ de arsênio total. O resultado mostra que $As_i(III)$ não está presente na amostra em concentração acima do limite de detecção, e usando L-cisteína na concentração de 3% (m/v), obteve-se $60,5 \mu g L^{-1}$ de As_i total, atingindo 100% de recuperação.

A técnica de extração assistida por micro-onda mostrou-se eficaz para a extração de As total no material certificado de plâncton BCR414, atingindo um nível 93% de recuperação. Também se mostrou eficiente para manter as espécies de As inorgânico ($As_i(III)$ e $As_i(V)$) inalteradas, sendo assim uma técnica promissora para o preparo de amostras para a análise de especiação.

Abstract

Evaluation of a FI-HG-MF-AAS system and microwave-assisted extraction on inorganic arsenic speciation

Author: Eraldo Luiz Lehmann

Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Co-adviser: Profa. Dra. Anne-Hélène Fostier

In this work a Flow Injection - Hydride Generation - Metallic Furnace - Atomic Absorption Spectrometry (FI-HG-MF-AAS) system was evaluated, using an Incone600® alloy tube as a metallic oven, as well as the technique of microwave-assisted extraction (MAE) for sample preparation aiming speciation of inorganic arsenic.

For the FI-HG-MF-AAS system, mild conditions (buffered media at pH 4.5 and concentration of tetrahydridoborate (1-) 0.1% (m/v)) allow that only iAs(III) generates hydride (arsane - AsH₃), reaching a detection limit of 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and limit of quantification of 6.6 $\mu\text{g L}^{-1}$, making suitable for its use in analysis according to Brazilian's Ministry of Health and World Health Organization (WHO) for drinking water. The inorganic As(V) did not show signal in mild conditions, and only the use of L-cysteine as pre-reducing agent was efficient in its conversion to inorganic As(III). The recovery test was carried out using reference material NIST 1643e, Trace elements in water, with 60.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total arsenic. The result shows that inorganic As(III) is not present at concentration above the limit of detection, and using L-cysteine 3% (w/v), was obtain a total inorganic As concentration of 60.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, reaching a recovery of 100%.

Microwave-assisted extraction technique was effective for the extraction of the total arsenic in certified plankton BCR414 material, reaching a recovery level of 93%. Additionally, it also proved to be effective in preserving the species of unchanged inorganic arsenic, making it a promising technique for sample preparation aiming a speciation analyzes.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABRECIATURAS E ACRÔNIMOS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Arsênio: meio ambiente e toxicologia.....	3
2.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama empregando Geração de Hidretos (HG-FAAS) para a determinação de As.....	9
2.3. Extração assistida por Micro-onda.....	12
2.4. Especiação e química analítica.....	16
3. OBJETIVO.....	19
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
4.1. Materiais e Reagentes.....	20
4.1.1. Reagentes.....	20
4.1.2. Equipamentos.....	21
4.2. Procedimentos.....	22
4.2.1. Avaliação do Sistema FI-HG-MF-AAS.....	22
4.2.2. Avaliação da Extração Assistida por Micro-onda.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1. Otimização do carregador.....	29
5.2. Otimização do meio reacional dos padrões e amostras.....	31
5.3. Otimização da vazão do carregador.....	36
5.4. Otimização do comprimento da bobina de reação.....	37
5.5. Otimização de concentração de tetraidridoborato(1-) (THB) de sódio.....	38
5.6. Otimização da vazão de ar e de acetileno na chama.....	40
5.7. Otimização da vazão de argônio no separador gás-líquido.....	42
5.8. Desempenho analítico.....	43
5.9 Otimização de pré-redutor.....	44

5.10. Extração assistida por Micro-onda.....	47
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO I – Carta de certificação do material NIST 1643e – Traço de elementos em água.....	61
ANEXO II – Carta de certificação do material BCR414 –Plancton.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

Sigla ou acrônimo	Significado
AB	Arsenobetaina.
AC	Arsenocolina.
ADP	Adenosina difosfato
As _i (III)	Arsênio inorgânico no estado de oxidação 3+.
As _i (V)	Arsênio inorgânico no estado de oxidação 5+.
As _i total	Arsênio inorgânico total, somatória de As _i (III) e As _i (V).
ATP	Adenosina trifosfato
BG	Correção de fundo, do inglês <i>background correction</i> .
ca.	Cerca de, abreviação da palavra em latim <i>circa</i> .
CE	Eletroforese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CHG	Geração química de hidretos voláteis, do inglês, <i>Chemical Hydride Generation</i>
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente.
CT-HG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e aprisionamento criogênico, do inglês <i>Criotrapping- Hydride Generation – Atomic Absorption Spectrometry</i> .
Cyt-19	Enzima Arsenometiltransferase.
DMA	Ácido dimetilarsínico, do inglês <i>dimethylarsinic acid</i> . Também é conhecido como ácido cacodílico, em inglês <i>cacodilic acid</i> .
DMA ^{III}	Ácido dimetilarsinoso – do inglês, <i>dimethylarsinous acid</i> .
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i> .
DVB	Divinilbenzeno
ϵ'	Constante dielétrica de um meio líquido.
ϵ''	Perda dielétrica de um meio líquido.
E	Potencial do meio, corrigido para o potencial do hidrogênio. ($E = (E^{Pt/Ag/AgCl}/1000)+0,199$)

E^0	Potencial padrão da reação de oxirredução, medido em relação ao potencial do hidrogênio.
$E^{Pt/Ag/AgCl}$	Potencial do meio, medido com um eletrodo de Platina com referência de Prata/Cloreto de Prata em gel saturado de KCl
<i>et al.</i>	Abreviação da expressão em latim <i>et alii</i> (e outros).
EPA	Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i> .
F	Constante de Faraday (96485 C mol ⁻¹).
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> .
FI-HG-MF-AAS	Injeção em fluxo com geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica com atomização em forno metálico, do inglês <i>Flow Injection - Hydride Generation - Metallic Furnace - Atomic Absorption Spectrometry</i> .
GC-MS	Cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas, do inglês <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> .
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> .
GSH	Glutaciona.
HG	Geração de Hidretos, do inglês <i>Hydride Generation</i> .
HG-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i> .
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> .
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> .

ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> .
LD	Limite de detecção.
LQ	Limite de quantificação.
MAE	Extração Assistida por Micro-onda, do inglês <i>Microwave-assisted extraction</i> .
MAEE	Extração Enzimática Assistida por Micro-onda, do inglês <i>Microwave-assisted enzymatic extraction</i> .
MMA	Ácido metilarsônico, do inglês <i>Monomethylarsonic acid</i> .
MMA ^{III}	Ácido metilarsonoso – do inglês, <i>monomethylarsonous acid</i> .
n	Número de elétrons transferidos durante a reação de oxirredução.
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	Politetrafluoretileno
R	Constante universal dos gases perfeitos (8,315 J K ⁻¹ mol ⁻¹).
QTA	Atomizador de Tubo de Quartzo, do inglês <i>Quartz Tube Atomizer</i>
SAM	Enzima S-adenosil l-metionina.
σ_{n-1}	Estimativa do desvio padrão da média
SPME	Micro-extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Micro Extraction</i>
T	Temperatura (K).
tg δ	Fator de dissipação de energia de um meio líquido.
THB	Tetraidridoborato(1-), do inglês <i>tetrahydridoborate(1-)</i> .
TMAO	Óxido de trimetilarsano, do inglês <i>Trimethylarsane oxide</i> .
TS-FF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica baseada em tubo na chama e Spray térmico, do inglês <i>Thermospray - Flame Furnace - Atomic Absorption spectrometry</i> .

VMP	Valor máximo permitido.
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i> .

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Nomenclaturas recomendadas e usualmente observadas na geração química de hidretos voláteis.....	9
Tabela 2: Programa para análise de As em GF AAS sugerido pelo fabricante Perkin Elmer.....	21
Tabela 3: Valores otimizados para análise de As por FI-HG-MF-AAS por Klassen <i>et al.</i>	23
Tabela 4: Condições propostas por González <i>et al.</i>	24
Tabela 5: Condições a serem estudadas para o novo sistema FI-HG-MF-AAS.....	25
Tabela 6: Programa utilizado para a extração de arsênio.....	25
Tabela 7: Condições otimizadas para o novo sistema FI-HG-MF-AAS.....	43
Tabela 8: Potenciais dos redutores em pH 4,5.....	45
Tabela 9: Resultados da extração de arsênio.....	47
Tabela 10: Resultados obtidos para o padrão de As _i (III).....	48
Tabela 11: Calculo da razão H ₃ AsO ₃ /H ₃ AsO ₄ pelo potencial do meio, utilizando Equação 4.....	49
Tabela 12: Resultados obtidos para o padrão de As _i (III) 25 µg L ⁻¹ com L-cisteína.....	49
Tabela 13: Resultados obtidos para o padrão de As _i (V) 25 µg L ⁻¹ com L-cisteína.....	50
Tabela 14: Resultados obtidos para o extrato de BCR414 com L-cisteína.....	50

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Exemplos de organoarsênios: (a) ácido metilarsonoso - MMA(III); (b) ácido dimetilarsinoso - DMA(III), (c) Trimetilarsano; (d) ácido metilarsônico - MMA; (e) ácido dimetilarsínico ou cacodílico - DMA; (f) Óxido de trimetilarsano (TMAO); (g) Arsenocolina (AC); (h) Arsenobetaina (AB); (i) Arsenoaçúcar dimetilado; (j) Arsenoaçúcar trimetilado.....	6
Figura 2: Mecanismos proposto por Hayakawa <i>et al.</i> para a metilação do As(V).....	7
Figura 3: (a) Imagem demonstrando o tubo metálico sobre a chama; (b) Tubo metálico com a chama do equipamento ativada.....	11
Figura 4: Imagem do tubo metálico indicando os furos na parte inferior e o de inserção do capilar cerâmico na parte superior.....	11
Figura 5: (a) Imagem do separador gás-líquido; (b) Corte transversal do separador gás-líquido.....	12
Figura 6: Esquema do sistema de injeção em fluxo, na posição de amostragem.....	22
Figura 7: Adaptação do sistema do proposto por Gonzalez <i>et al.</i> [47], na posição de amostragem.....	24
Figura 8: Regressão linear das absorvâncias integradas médias (n=3) obtidas no sistema proposto por Klassen <i>et al.</i>	27
Figura 9: Curvas analíticas (n=3) de As _i (III) e As _i (V) sem pré-redutor nas condições apresentadas na Tabela 3.....	28
Figura 10: Curvas analíticas obtidas empregando HCl 2% (v/v) como carregador (n=5).....	30
Figura 11: Curvas analíticas obtidas empregando ar como carregador (n=5).....	30
Figura 12: Curvas analíticas obtidas empregando tampão citrato pH 4,5 como meio reacional (n=5).....	32

Figura 13: Distribuição teórica das espécies em equilíbrio em função do pH para $As_i(V)$, calculado nesta dissertação a partir dos respectivos pKa's do ácido arsênico.....	33
Figura 14: Distribuição teórica das espécies em equilíbrio em função do pH para $As_i(III)$, calculado nesta dissertação a partir dos respectivos pKa's do ácido arsenoso.....	34
Figura 15: Mecanismos de geração de arsano a partir do ácido arsênico.....	34
Figura 16: Diagrama E_H x pH teórico para as espécies de arsênio inorgânico, calculado nesta dissertação a partir dos respectivos pKa's dos ácidos arsênico e arsenoso e do potencial padrão de oxirredução entre eles.....	35
Figura 17: Sinal analítico médio (n=5) para um padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função da vazão do carregador.....	36
Figura 18: Absorbância em função do tempo de leitura para as vazões: — $9,0 mL min^{-1}$; — $9,9 mL min^{-1}$	37
Figura 19: Sinal analítico médio (n=5) para um padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função do comprimento da bobina de reação.....	38
Figura 20: Sinal analítico médio (n=5) para um padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função da concentração de THB.....	39
Figura 21: Absorbância em função do tempo de leitura para cada uma das concentrações de THB testadas: — $0,05\%(m/v)$; — $0,10\%(m/v)$; — $0,20\%(m/v)$; — $0,30\%(m/v)$	39
Figura 22: Sinal analítico médio (n=5) para um padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função da vazão de ar na chama.....	41
Figura 23: Sinal analítico médio (n=5) para um padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função da vazão de acetileno na chama, fixando.	41
Figura 24: Sinal analítico médio (n=5) para padrão de $As_i(III)$ $50 \mu g L^{-1}$ em função da vazão de argônio do separador gás-líquido.....	42
Figura 25: Curva analítica obtida nas condições otimizadas apresentadas na Tabela 5.....	43

Figura 26: Comparação entre os pré-redutores para o sistema FI-HG-MF-AAS proposto.....	44
Figura 27: Estrutura molecular de (a) L-cisteína e (b) ácido tioglicólico.....	45
Figura 28: Recuperação média (n=5) para padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{As}_i(\text{V})$ em função da concentração de L-cisteína no meio.....	46

LISTA DE EQUAÇÕES

Página

Equação 1: Equação química da reação de redução do ácido arsênico para o ácido arsenoso.....	3
Equação 2: Equação de <i>Nernst</i> para a Equação 1.....	3
Equação 3: Equação 2 substituindo o valor de E^0 por 0,559 V, T por 298,2K (25°C), R por 8,315 J K ⁻¹ mol ⁻¹ , F por 96485 C mol ⁻¹ e n por 2 elétrons, transformando o logaritmo natural em logaritmo decimal, isolando a concentração de [H ⁺] e transformado em pH.....	3
Equação 4: Fórmula para o cálculo da relação As(III):As(V), derivada da Equação 3	4
Equação 5: Equação química para a geração de hidrogênio radicalar a partir da reação de zinco metálico em meio ácido.....	9
Equação 6: Equação química para a geração de hidrogênio radicalar a partir da decomposição ácida do THB.....	9
Equação 7: Equação química para reação de ácido arsênico com THB para formar ácido arsenoso.....	28
Equação 8: Equação química para reação de ácido arsenoso com THB para formar arsano.....	28
Equação 9: Equação química para a segunda desprotonação do ácido cítrico.....	32
Equação 10: Fórmula para o cálculo da força iônica de uma solução.....	32

1. INTRODUÇÃO:

Desde 2000, a IUPAC define *Especiação* ou *Especiação de um Elemento* como a distribuição de um elemento químico entre definidas espécies em um sistema; *Espécie química*, por sua vez, é definida com a forma específica de um elemento definido como a composição isotópica, como carbono 12, 13 e 14, eletrônica ou estado de oxidação, como cromo trivalente e hexavalente, e/ou estrutura molecular ou de complexo, como compostos organometálicos; *Análise de especiação* é definida pelas atividades de análise de identificação e/ou medição das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra. A IUPAC também define como *Fracionamento* o processo de classificação de uma substância ou um grupo de analitos a partir de uma determinada amostra de acordo com propriedades físicas (por exemplo, tamanho, solubilidade) ou químicas (por exemplo, ligação, reatividade). Vale à pena enfatizar que *Fracionamento* **não é** *Especiação*, porém, pode permitir uma futura especiação [1].

A especiação de elementos químicos tem sido amplamente estudada nos últimos anos. A determinação das espécies presentes em um determinado tipo de matriz é do interesse de várias áreas científicas, como medicina, ambiente, saúde ocupacional, entre outras. Os efeitos de diferentes estados de oxidação de um mesmo elemento sobre a saúde humana e meio ambiente são conhecidos e amplamente estudados, como os efeitos do Cromo (VI), extremamente carcinogênico e mutagênico [2], enquanto o Cromo (III) é considerado um micronutriente [3].

Em matrizes sólidas, existe, normalmente, a necessidade de solubilizar os analitos para que estes possam ser identificados e quantificados. Métodos convencionais para a solubilização utilizando energia micro-onda em frascos fechados empregam a adição de ácidos minerais, sozinhos ou combinados. A mistura mais utilizada é a de ácido nítrico (HNO_3) com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois apresenta um alto poder de oxidação [4]. Entretanto, devido a essa característica oxidante, a mistura pode destruir compostos organometálicos de interesse e converter as espécies presentes ao estado de oxidação mais elevado, o que pode alterar a distribuição das espécies de um dado elemento na matriz estudada.

A distribuição das espécies de arsênio inorgânico ($\text{As}_i(\text{III})$ e $\text{As}_i(\text{V})$) em meio aquático depende das condições de pH e potencial redox do meio. Em condições oxidantes, predominam as espécies de arsênio pentavalente, principalmente da forma de oxiânions ($\text{H}_2\text{AsO}_4^-/\text{pK}_a=2,19$; $\text{HAsO}_4^{2-}/\text{pK}_a=6,94$). Por outro lado, em condições redutoras, o arsênio trivalente é a forma termodinamicamente mais estável, a qual está presente principalmente na forma de ácido arsenoso ($\text{H}_3\text{AsO}_3/\text{pK}_{a1}=9,22$) no pH natural da água [5]. Porém, já foi observado que o metabolismo por organismos vivos de oxiânions de arsênio envolve processo de metilação oxidativa e redutiva, gerando espécies como metilarsonito ($\text{CH}_3\text{AsO}_2^{2-} = \text{MMA}^{\text{III}}$), dimetilarsinito ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}^- = \text{DMA}^{\text{III}}$), metilarsonato ($\text{CH}_3\text{AsO}_3^{2-} = \text{MMA}$) e dimetilarsinato ou cacodilato ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^- = \text{DMA}$), contudo essas espécies não são tão estudadas devido a suas menores toxicidades frente às formas não metiladas dos oxiânions de arsênio, e suas menores quantidades no meio ambiente [6]. Porém, MMA e DMA são utilizados em biocidas, tornando-se, portanto, importante suas quantificações [6].

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1. Arsênio: meio ambiente e toxicologia

Arsênio é o vigésimo elemento em abundância na crosta terrestre, décimo quarto na água do mar e décimo segundo no corpo humano. Desde que foi isolado em 1250, foi aplicado nas áreas médicas, agrícolas, pecuárias, eletrônicas e metalúrgicas, porém, já foi reconhecido que pode ser carcinogênico mesmo em baixas concentrações [7].

Na crosta terrestre, arsênio compreende cerca de 0,00005% da sua composição distribuídos em diversos minérios, como Arsênio mineral (As^0), Arsenopirita (FeAsS), Arsenolita (As_2O_3) e Nicolita (NiAs) [7]. Também é possível encontrar espécies metiladas devido à presença de bactérias (como *Escherichia coli*, *Flavobacterim sp*, *Methanobacterium sp*) e fungos (como *Aspergillus glaucus* e *Candida humicola*) que podem biometilar o arsênio[7].

Em águas naturais, esse elemento é encontrado em baixas concentrações, sendo que o VMP de arsênio total para a água ser considerada potável é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de acordo com a EPA [8], WHO [9] e Ministério da Saúde [10]. Para o descarte de efluentes líquidos, o máximo permitido é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, de acordo com o CONAMA[11], também em termos de arsênio total.

A razão As(III):As(V) em águas naturais oxigenadas, calculada pela *Equação de Nernst* (vide Equação 1-4), é de $1:10^{26}$ [7,12]; porém, o encontrado varia entre 10:1 e 1:10, devido à ação redutora de micro-organismos presentes na água [12].



$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4][\text{H}^+]^2} \quad \text{Equação 2}$$

$$E = 0,559 - 0,0296 \left(\log_{10} \frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4]} + 2\text{pH} \right) \quad \text{Equação 3}$$

$$\frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4]} = 10^{\frac{0,559 - E - 0,0592\text{pH}}{0,0296}} \quad \text{Equação 4}$$

Na Equação 1, observamos a reação de redução do ácido arsênico para ácido arsenoso; na Equação 2 temos a equação de Nernst para a Equação 1; na Equação 3 temos a Equação de Nernst substituindo o valor de E^0 por 0,559V, T por 298,2K (25°C), R por 8,315 J K⁻¹ mol⁻¹, F por 96485 C mol⁻¹ e n por 2 elétrons, transformando o logaritmo natural em logaritmo de base decimal, isolando a concentração de [H⁺] e transformado em pH; na Equação 4 temos a fórmula para o cálculo da relação As_i(III):As_i(V), isolando-a a partir da Equação 3.

A concentração de arsênio encontrada em águas naturais não poluídas varia entre 1 e 10 µg L⁻¹, aumentando de 100 até 500 µg L⁻¹ em águas próximas a minerações, principalmente de enxofre. As concentrações baixas em águas naturais devem-se ao fato do arsênio ser adsorvido em material particulado [7].

No ar, arsênio é encontrado principalmente adsorvido no material particulado, numa concentração entre 0,4 e 30 ng m⁻³, e usualmente se encontra arsenito e arsenato, e as espécies orgânicas menos importantes exceto por áreas onde o arsênio é utilizado como pesticida [7].

Para organismos vivos, o arsênio é considerado um elemento com caráter acumulativo, isto é, uma vez capturado ou ingerido pelo organismo, leva-se um tempo longo para ele ser eliminado, levando a uma taxa de eliminação menor que a taxa de assimilação. Vegetais podem capturar o arsênio principalmente a partir de solos contaminados, com concentrações podendo variar de 0,01 até 5 µg g⁻¹ em base seca. Dificilmente animais serão envenenados por ingerir plantas contaminadas por arsênio, pois estas apresentam danos antes de atingir níveis tóxicos para o consumo [7].

Em animais marinhos, encontram-se níveis entre 0,005 e 0,3 mg kg⁻¹ em celenterados (hidras e corais), alguns moluscos e crustáceos; alguns mariscos podem conter acima de 100 µg g⁻¹ do elementos. Em peixes de água doce, a concentração média é de 0,54 µg g⁻¹

com base em massa úmida, porém, já foram encontrados $77,0 \mu\text{g g}^{-1}$ em óleos de fígado de robalo [7].

Em mamíferos, o arsênio se acumula principalmente em cabelos e unhas, devido sua alta afinidade por queratina, normalmente nas formas inorgânicas. Em animais domésticos e seres humanos a concentração desse elemento é inferior a $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ em base úmida, sendo que a quantidade total de arsênio no corpo humano varia entre 3 e 4 mg, mas tende aumentar com o envelhecimento, sendo que a absorção de arsênio é maior para as espécies iônicas. No cabelo humano, a concentração varia entre $0,08$ e $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$; concentrações superiores a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ no cabelo indicam contaminação por arsênio, e analisando sua concentração ao longo do cabelo pode-se estimar o tempo de exposição ao elemento [7].

O arsênio pode também contaminar o ambiente por ação antropogênica, devido ao seu uso como inseticida, herbicida, dissecante e preservante de madeira, aditivos alimentares e medicamentos. Na Áustria, por exemplo, camponeses ingeriam grandes quantidades de arsênio, acreditando que dava uma aparência sadia e um corpo robusto; hoje em dia já se conhece seu efeito tóxico, e suspeita-se que até a morte de Napoleão Bonaparte deu-se por envenenamento por arsênio [7].

Seres humanos são expostos às diversas formas de arsênio, tanto inorgânicas quanto orgânicas, com propriedades fisicoquímicas, biodisponibilidades e cinética de metabolismo diferentes. A via de exposição de arsênio pode ser por via respiratória, por poeira e fumos, e oral, por ingestão de água, bebidas e alimentos. Pouco se estudou sobre absorção pela pele. A biodisponibilidade do arsênio depende da matriz na qual se encontra e de sua solubilidade, além de presença de outros nutrientes no trato gastrointestinal [7].

O mecanismo de assimilação de arsênio por organismos pode passar por processos de redução e metilação, os quais podem formar uma variedade de compostos. Por exemplo, arsenobetaína (AB) é a forma mais abundante de As em animais marinhos, enquanto arsenoaçúcares são as espécies predominantes em algas marinhas. Entretanto, também são detectados DMA, As Inorgânico (As (III) +As(V)) e AB [13].

Na Figura 1, podem-se observar exemplos de espécies de organoarsênio.

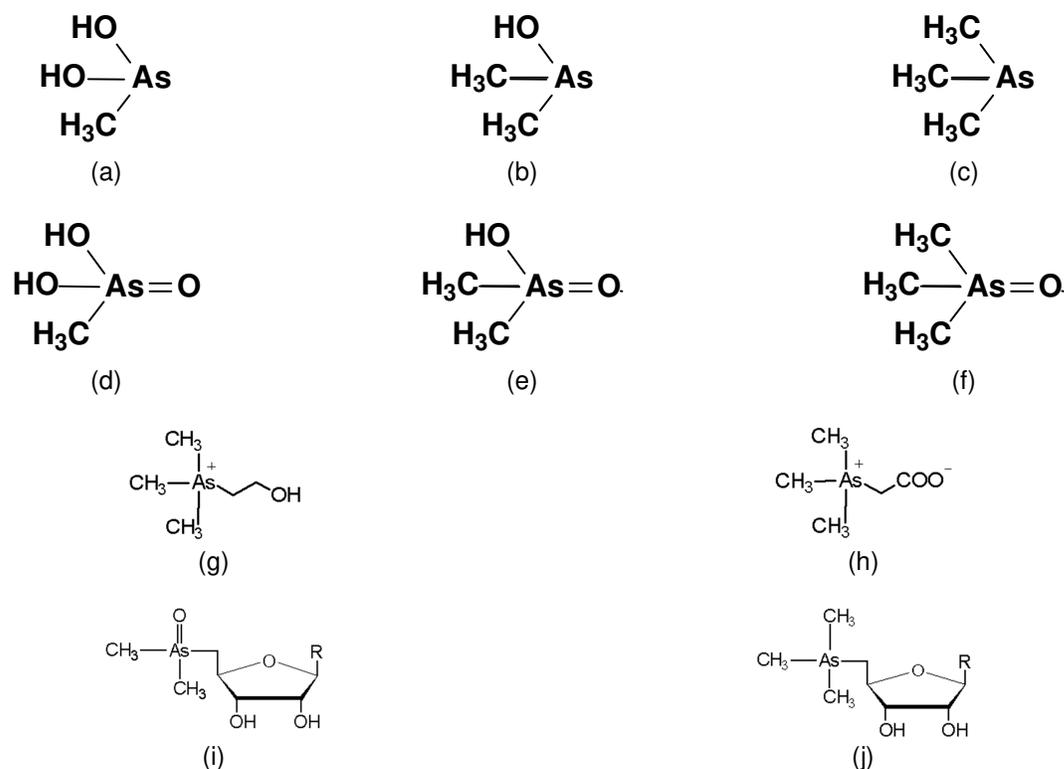


Figura 1: Exemplos de organoarsênio: (a) ácido metilarsonoso - MMA(III); (b) ácido dimetilarsinoso - DMA(III), (c) Trimetilarsano; (d) ácido metilarsonico - MMA; (e) ácido dimetilarsínico ou cacodílico - DMA; (f) Óxido de trimetilarsano (TMAO); (g) Arsenocolina (AC); (h) Arsenobetaína (AB); (i) Arsenoaçúcar dimetilado; (j) Arsenoaçúcar trimetilado

Microalgas que compõe o fitoplâncton são as principais fontes de alimento para organismos maiores e contribuem para o ciclo do arsênio. O fito plâncton é considerado o principal responsável pela produção de $\text{As}_i(\text{III})$, MMA e DMA em ambientes marinhos. Por isso, as microalgas são empregadas em estudos sobre a cadeia alimentar para elucidar a formação de AB em organismos maiores [14].

Considera-se que o arsênio é capturado por organismos como $\text{As}_i(\text{V})$, por meio de transporte de fosfato pela membrana celular, e convertido a $\text{As}_i(\text{III})$, pois $\text{As}_i(\text{V})$ interfere em rotas metabólicas associadas à fosforilação. Essa captura ocorre em altas concentrações de As, as quais podem influenciar nas concentrações de As total dentro dos organismos, bem como nas proporções de As inorgânico e As orgânico [14]. Hayakawa *et al.* [15] realizaram um estudo cinético em fígado de rato para propor um mecanismos da conversão de $\text{As}_i(\text{V})$ às suas espécies metiladas (Vide Figura 2)

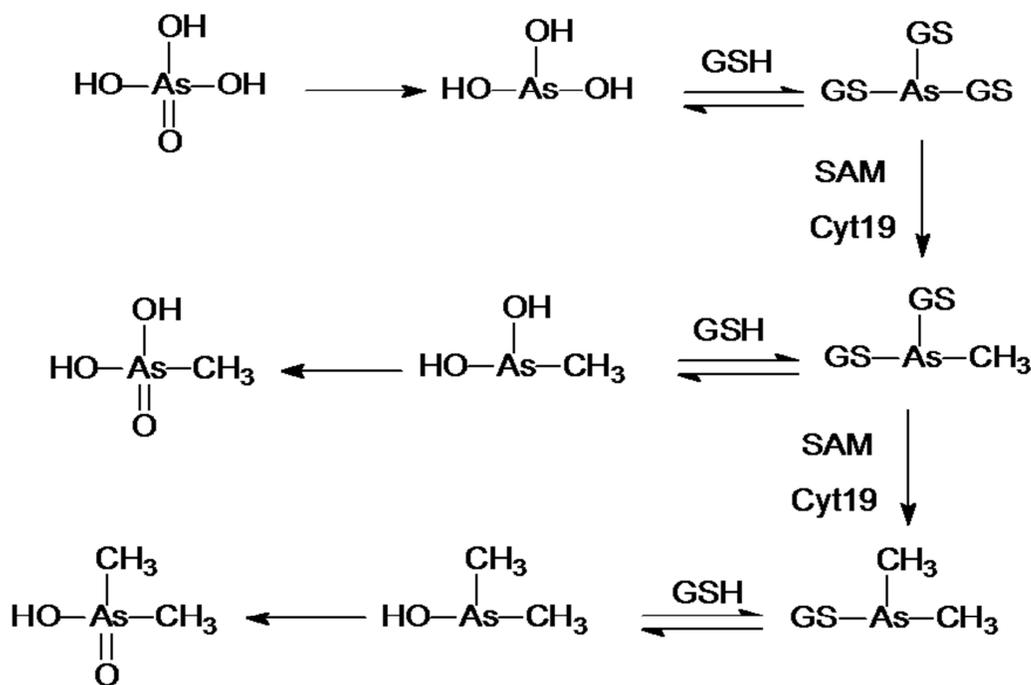


Figura 2: Mecanismos proposto por Hayakawa *et al.* [15] para a metilação do As(V)

Estudos também indicam que a metilação em seres humanos começa para limitar a concentração de arsênio inorgânico entre 0,2 e 1 mg kg⁻¹. Em condições normais, isto é, sem a ingestão excessiva de arsênio inorgânico, cerca de 60% de arsênio eliminado na urina está na forma de DMA, 20% na forma inorgânica e 20% na forma de MMA. Arsenobetaína e arsenoaçúcares são eliminados sem qualquer alteração. O arsênio ainda pode ser eliminado pelo suor, em menor quantidade; devido sua alta afinidade por queratina, cabelos, pele e unhas podem ser consideradas também como rotas de excreção de arsênio. Em seres humanos, esse elemento pode ainda ser excretado pelo leite materno [7].

A toxicidade dos compostos de arsênio depende tanto da forma quanto do estado de oxidação, decaindo dessa maneira: arsano > AsO₃³⁻ > Organoarsênios trivalentes > AsO₄³⁻ > Organoarsênios pentavalente > As⁰. Por essa forma, considera-se que o mecanismo de metilação faz parte da rota de desintoxicação e excreção do arsênio. Porém, estudos já demonstraram que MMA^{III} é 26 vezes mais tóxico para hepatócitos e apresenta potencial inibidor de tiorredoxina redutase (*in vitro*) 100 vezes maior que As_i(III). Outros estudos mostraram que MMA^{III} e DMA^{III} formam complexos com GSH, assim como As_i(III), que são, no mínimo, tão tóxicos quanto o próprio As_i(III). MMA^{III} e DMA^{III} também podem causar dano no DNA de linfócitos periféricos [7].

Outro efeito tóxico do arsênio é a inativação de enzimas. O arsênio trivalente liga-se a grupos sulfidrilas e hidroxilas, principalmente se forem dois grupos sulfidrilas adjacentes. Um exemplo é a inativação da piruvato desidrogenase pela complexação com $As_3(III)$, impedindo a geração de adenosina-5-trifosfato (ATP). Porém, se o arsênio se ligar a grupos sulfidrilas não essenciais, pode-se ter uma importante rota de detoxicação de arsênio, como, por exemplo, a presença deste elemento em cabelo e unha [7].

$As_5(V)$ não interage com grupos sulfidrilas, porém, pode competir com o fosfato, impedindo a fosforilação oxidativa, processo responsável pela formação de ATP, pois forma um éster de arsenato com o ADP, que é instável e sofre hidrólise não enzimática. Arsenato também substitui fosfato no DNA, impedindo seu mecanismo de reparação [7].

Exposição crônica à arsênio inorgânico pode causar diversos efeitos na saúde, incluindo: problemas respiratórios, como bronquite, rinite, faringite e perfuração do septo nasal; pulmonares; cardiovasculares, como infarto no miocárdio e arritmia cardíaca; gastrintestinais, como ressecamento da boca e garganta, esofagite, gastrite, colite, azia e anorexia; hematológicos, como anemia e leucopenia; hepáticos, como cirrose e neoplastia hepática primária; renais, como câncer, necrose cortical e falência renal; dérmicos, como queratose, hiperqueratose, melanose, leucomelanose e câncer; neurológicos, como dores de cabeça, letargia, confusão mental, alucinações e coma; má formação congênita de fetos e aumento de abortos espontâneos e diabetes mellitus [7].

Diversos episódios de envenenamento por exposição a arsênio foram reportados através do mundo, alguns devido a concentração naturalmente alta na região, como em Taiwan, Índia, Argentina, Condado Millard, Utah, Condado Lane, Oregon, Nevada, New Hampshire e Condado Lassen, Califórnia, nos Estados Unidos, Ontário e Nova Escócia, no Canadá, Hungria, Nova Zelândia, Polônia, Alaska, Siri Lanka, Espanha, China, Fukuoka, no Japão, e Vietnã; outros foram por contaminação industrial, como os da Tailândia, Filipinas, Nakajo, Toroku e Matsuo, no Japão, Calcutá, na Índia, Austrália, República Tcheca, Toronto, no Canadá, Grécia, Montana, nos Estados Unidos, Inglaterra, Terron, no México, Suécia, Escócia e Bulgária; tem incidente ainda por contaminação em alimentos e bebidas, como o do Shoio e leite em pó no Japão, vinho na Inglaterra e na Alemanha, e na China [7].

2.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama empregando Geração de Hidretos (HG-FAAS) para a determinação de As:

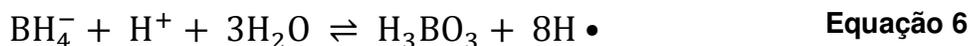
A geração de espécies voláteis é uma técnica muito empregada na determinação em nível de traço e ultratraço e na especificação química pela química analítica. As técnicas mais populares para a geração espécies voláteis trabalham com os elementos que formam hidretos voláteis e o mercúrio, que podem ser obtidos por meio de estratégias diferentes de derivatização, como geração química, geração eletroquímica, geração fotoquímica e geração sonoquímica [16].

Na Tabela 1 são apresentadas algumas nomenclaturas empregadas na técnica de geração de hidretos para análise de arsênio.

Tabela 1: Nomenclaturas recomendadas e usualmente observadas na geração química de hidretos voláteis[16]

Formula química	Nomenclatura recomendada pela IUPAC [17]	Outras nomenclaturas frequentemente observadas na literatura
AsH ₃	Arsano (nome parental do hidreto), triidridoarseno, triidreto de arsênio	Arsina, hidreto de arsênio
BH ₄ ⁻	Tetraidridoborato(1-), boranueto	Tetraidroborato(III), tetraidroborato, boroidreto

Em 1961 foi reportado, pela primeira vez, a preparação de arsano e seu dímero diarsano (H₂As-AsH₂) pela reação de espécies de arsênio como tetraidridoborato(1-) (THB) de sódio. Em 1969, foi evidenciada a vantagem de introduzir o hidreto gasoso para a determinação de arsênio por espectrometria atômica. Inicialmente, esse arsano era gerado pela reação de arsênio hidrogênio radicalar formado na reação de zinco metálico em meio ácido, mas foi substituído por THB em 1972 [16].



Na Equação 5 e na Equação 6 observamos a geração de hidrogênio radical a partir da reação de zinco metálico em meio ácido e da decomposição ácida do THB, respectivamente.

Acoplando a técnica de geração química de hidretos voláteis com as técnicas de espectrometria atômica ou de massas, obtêm-se as melhores técnicas para a análise de elementos dos Grupos 14, 15 e 16 em concentrações abaixo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, empregado principalmente THB de sódio, muito menos frequente o de potássio. Outros boranos, como cianotrihidridoborato(1-) (BH_3CN^-) e aminoboranos, também já foram empregados. Embora sua eficiência em termos de desempenho analítico não foi totalmente explorada, esses boranos são muito úteis nos estudos de mecanismo na técnica de geração química de hidretos [16].

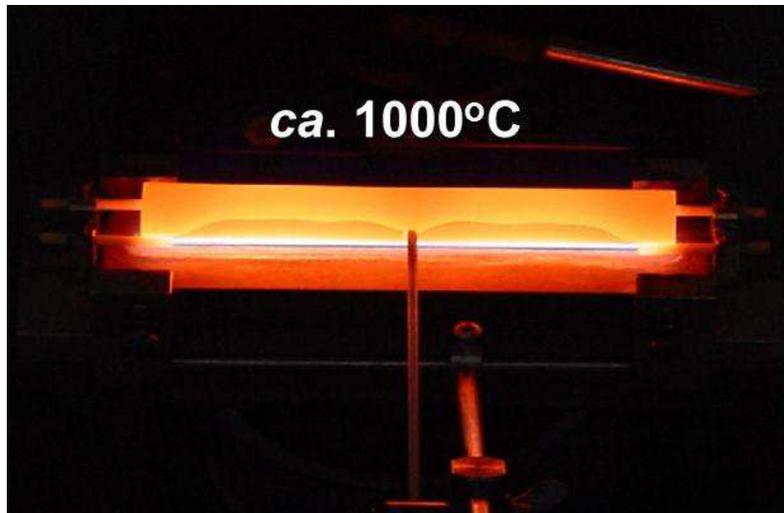
O arsano (AsH_3) é obtido a partir do $\text{As}_i(\text{III})$ em uma ampla faixa de pH, desde soluções de ácido clorídrico $9-10 \text{ mol L}^{-1}$ até soluções tamponadas com pH próximo ao neutro. É importante ressaltar que a formação de hidreto a partir do $\text{As}_i(\text{V})$ não pode ser realizada em valores de pH acima de 0,5, sendo necessário uma pré-redução, utilizando normalmente KI, ou, mais dificilmente, NaI [18]. Deve-se também levar em consideração que espécies metiladas de arsênio podem apresentar diferentes comportamentos na geração de hidretos em função do pH do meio [19], e arsenoaçúcares formam arsano de maneira menos eficaz que as espécies inorgânicas e metiladas [19].

A Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HG-AAS) é muito utilizada na separação e quantificação de arsênio, na faixa de $0,01 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ [20]. Para se trabalhar com HG-AAS, utiliza-se uma cela de quartzo a altas temperaturas [21,22] e fornos de grafite [23] como atomizadores. Porém, em 2007, foi publicado o primeiro trabalho por Figueiredo *et al.*, utilizando um tubo metálico de liga Inconel 600® (min. 72,0% de Ni, 14,0-17,0% de Cr e 6,0-10,0% de Fe), sobre a chama de ar: acetileno (vide Figura 3) como atomizador para a determinação de antimônio pela técnica de geração de hidretos para amostras ambientais e farmacêuticas. Foi utilizado um tubo de 10 cm de comprimento por 13 mm de diâmetro interno sobre a chama, sendo que o tubo apresentava seis furos na parte inferior (vide Figura 4) para permitir que a chama entrasse parcialmente no tubo para atomizar o hidreto [24], similar à técnica TS-FF-AAS [25, 26, 27]. O hidreto era inserido dentro do tubo metálico por um orifício na parte superior (vide Figura 3b e Figura 4) do tubo com auxílio de um

capilar cerâmico, também de maneira análoga à técnica de TS-FF-AAS [25, 26, 27], e era separado da solução em um separador gás-líquido, proposto por Ribeiro *et al.* [28] (vide Figura 5).



(a)



(b)

Figura 3: (a) Imagem demonstrando o tubo metálico sobre a chama; (b) Tubo metálico com a chama do equipamento ativada.



Figura 4: Imagem do tubo metálico indicando os furos na parte inferior e o de inserção do capilar cerâmico na parte superior.

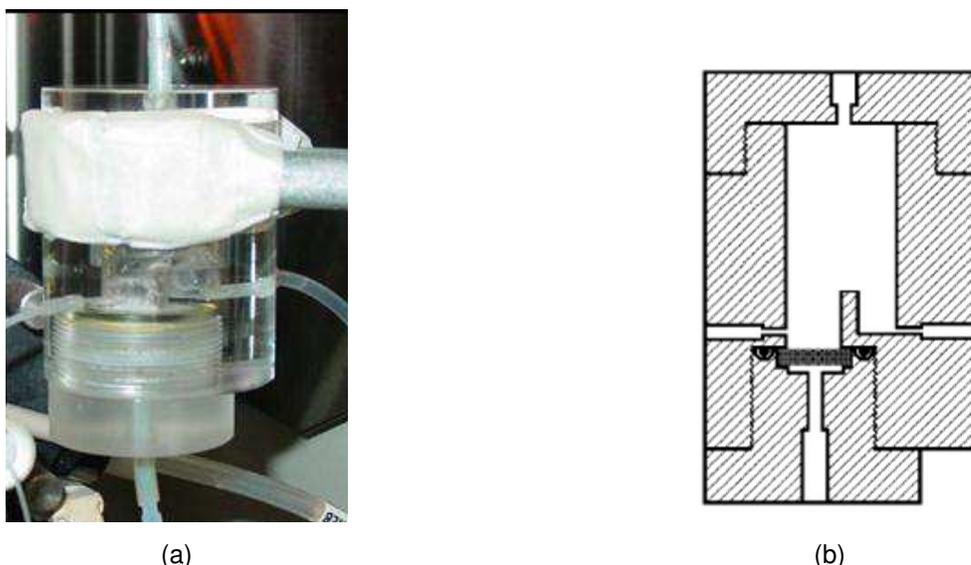


Figura 5: (a) Imagem do separador gás-líquido; (b) Corte transversal do separador gás-líquido, proposto por Ribeiro *et al.* [28]

O tubo metálico sobre a chama apresenta vantagens interessantes quando comparado com ao tubo de quartzo, principalmente a maior resistência mecânica, maior tempo de uso (superior a 2000h de trabalho) e um menor custo (*ca.* U\$7,00 cada tubo)[24]. Além disso, o tubo metálico também apresentou figuras de mérito iguais ou até mesmo melhores que outros métodos propostos na literatura para determinação de antimônio [24].

Em 2010, Klassen *et al.* [29] também utilizaram o atomizador metálico de liga Inconel600® com furos na parte inferior sobre uma chama de ar:acetileno, mas como atomizador para arsênio, em um sistema análogo ao de Figueiredo *et al.* [24]. Essa proposta será utilizada nessa dissertação e será mais bem detalhada posteriormente.

2.3. Extração assistida por Micro-onda:

O preparo de amostras é a etapa crítica nos métodos analíticos e ainda requer desenvolvimentos de acordo com a capacidade das técnicas instrumentais modernas. Uma das principais rotas dos recentes avanços está baseada nas técnicas assistidas por radiação micro-onda, usando fornos tipo cavidade ou focalizada com frascos fechados ou abertos[4].

As técnicas analíticas foram alavancadas pelos avanços na microeletrônica e dispositivos eletrônicos. Entretanto, as estratégias no preparo da amostra foram deixadas de

lado e continuam baseadas em procedimentos antigos. Apesar do sucesso em seu uso, essas técnicas não são mais compatíveis com os requerimentos modernos para um melhor controle de condições de reações, contaminação e introdução de amostra. Hoje em dia está claro que toda a capacidade analítica será alcançada apenas com um controle apropriado do branco analítico, que está relacionado com o preparo de amostra. Uma dessas estratégias é o uso de procedimentos baseados em micro-onda para o preparo de amostras [4].

Os efeitos de aquecimento causado pela radiação micro-onda foram descobertos durante a segunda guerra mundial enquanto se trabalhavam com o desenvolvimento de radares. Depois, com o desenvolvimento de um dispositivo capaz de emitir micro-onda em uma frequência constante e o conhecimento que algumas substâncias podem absorver essa radiação e converter em calor, foi possível a construção de equipamentos comerciais. Inicialmente, na química, foi usada para remover enxofre de carvão e na vulcanização da borracha. Em 1975, radiação micro-onda foi usada pela primeira vez no preparo de amostra. Atualmente, é usada também em sínteses orgânicas e inorgânicas, estudos cinéticos e qualquer procedimento químico crítico dependente da quantidade de energia e da taxa que esta é aplicada ao sistema [4].

A radiação micro-onda aquece rapidamente soluções contendo moléculas absorventes que se encontram dentro de frascos transparentes a micro-onda. Adicionalmente, a disponibilidade de frasco que suportam altas pressões, tão altas quanto 100 atm, permitem o uso de ácidos com altos pontos de ebulição, acelerando a reação e aumentando o seu poder de oxidação. Além disso, promove baixo consumo de reagentes, menores níveis de contaminação, melhor recuperação de compostos e elementos voláteis, maior reprodutibilidade, permite automação e operação segura [4].

O aquecimento por radiação micro-onda é baseado em dois fenômenos: rotação de dipolo e condução iônica. Para entender esses fenômenos, é importante considerar alguns conceitos. O primeiro é a *constante dielétrica* (ϵ'), que indica a capacidade do material obstruir a energia micro-onda que passar através dele; o segundo é a *perda dielétrica* (ϵ''), que indica a capacidade do material dissipar essa energia; o terceiro é o *fator de dissipação* ($\text{tg } \delta = \epsilon''/\epsilon'$) que indica a capacidade de certa substância em converter energia eletromagnética em energia calorífica em uma determinada frequência e temperatura [4].

A rotação de dipolo refere-se ao alinhamento das moléculas de acordo com seu dipolo por sua interação com o campo elétrico associado à radiação. Como o campo elétrico relacionado com o gerador de radiofrequência varia *ca.* $2,45 \times 10^9$ vezes s^{-1} , as moléculas são alinhadas e desalinhadas *ca.* $4,9 \times 10^9$ vezes s^{-1} . Essa movimentação das moléculas gera energia térmica por atrito. A eficiência desse processo depende da viscosidade do meio e do tempo de relaxação dielétrica, que é o tempo necessário para que 63% das moléculas alinhadas (baixa entropia) retornem à desordem inicial (alta entropia) quando o campo elétrico é removido. Se o inverso de tempo de relaxação dielétrica é muito maior ou muito menor do que a frequência de campo de electricidade, tempo de aquecimento vai aumentar. Isso ocorre porque cada molécula se desorganiza muito rápido, ou demora para se organizar [4].

A condução iônica é outro fenômeno responsável pelo aquecimento, devido a presença de eletrólitos fortes, positivos e negativos. Com a aplicação de um campo eletromagnético, os íons começam uma migração eletroforética em direção ao polo de carga oposta. Durante a migração, os íons sofrem resistência das moléculas de solvente, de moléculas neutras presente, e, principalmente, dos íons migrando na direção oposta, gerando calor (Efeito Joule). Esse fenômeno depende da concentração dos íons e das suas respectivas mobilidades iônicas [4].

Além disso, estudos comprovam que se pode gerar peróxido de hidrogênio e ácidos clorídrico, sulfúrico e nítrico pela reação de O_2 , Cl_2 , SO_2 , SO_3 e N_2 presentes no ar, e ácido fluorídrico pela reação do fluor proveniente do PTFE utilizado para a confecção dos frascos reacionais, com água usada como solvente em frascos fechados durante o programa do forno de micro-onda [30].

A técnica de Extração Assistida por Micro-onda (do inglês *Microwave-assisted Extraction* - MAE) vem sendo cada vez mais estudada, pois possibilita uma rápida extração de analitos de matrizes sólidas utilizando radiação micro-onda como fonte de energia, com a eficiência de extração comparável aos métodos de extrações clássicos, e utilizando solventes polares com constantes dielétricas altas como extrator, como água, metanol ou etanol [31]. Além disso, é também conhecida pelo baixo impacto ambiental, pois utiliza menores quantidades de solventes [32].

A MAE já foi utilizada para a extração de materiais orgânicos, como resíduos de pesticidas em abacate para posterior análise por HPLC com detector de fluorescência [32] e extração de hidrocarbonetos poliaromáticos e n-alcenos pesados de material particulado presente no óleo diesel para posterior análise por CG com detector espectrométrico de massas [33].

A água vem sendo empregada como solvente extrator para elementos químicos. Normalmente é feita uma mistura da amostra com água deionizada, a qual é agitada, e o sobrenadante é analisado. Nischwitz *et al.* [34] e Raab *et al.* [35] extraíram arsênio de algas; Karthikeyan *et al.* [36] utilizaram MAE para extrair arsênio, cobalto, cobre, cádmio, cromo, manganês, níquel, vanádio, zinco, ferro e chumbo de material particulado urbano e poeira urbana; Rahman *et al.* [37] extraíram arsênio de solo.

Algumas vezes, são empregados agentes complexantes juntamente com MAE para favorecer a solubilização dos elementos. Di Palma *et al.* [38] utilizaram ácido cítrico e EDTA para extrair cobre, chumbo, zinco, cálcio e ferro de sedimento portuário.

Algumas enzimas já foram utilizadas, associando-as à MAE, gerando a técnica denominada Extração Enzimática Assistida por Micro-onda (do inglês *MAEE- Microwave-assisted enzymatic extraction*). Dessa maneira, espécies de arsênio e selênio foram extraídas de tecido de peixe com auxílio de protease-E e lipase [39] e de arroz com auxílio de α -amilase [40].

Em MAE, já foram realizados estudos sobre a capacidade de extração de arsênio, utilizando material certificado de alga, junto com estudos sobre a variação no número de oxidação das espécies [41]. Nesse estudo, Salgado *et al.* extraíram de *Sargassum fulvellum*, *Chlorella vulgaris*, *Hizikia fusiformis* e *Laminaria digitata* as espécies $As_i(III)$, $As_i(V)$, DMA e MMA, empregando um sistema de micro-onda e a extração foi feita em frascos abertos utilizando água deionizada como solvente a uma temperatura de 90°C por 5 min. A mistura foi resfriada e centrifugada, e o sobrenadante analisado por HPLC-HG-ICP OES. As recuperações obtidas foram comparadas com as obtidas com extração assistida por ultrassom, e foi observado que a extração para arsênio (em termos de arsênio total) em algas por MAE é mais eficiente que a extração ultrassônica. No cromatograma de *S. fulvellum* apresentado pelos autores [41], foi possível observar a presença de quatro espécies de arsênio ($As_i(III)$, $As_i(V)$, DMA e MMA), porém, não existe certificação para as

suas concentrações no material estudado. Nischwitz *et al.*[34], Raab *et al.*[35] e Rahman *et al* [37] também analisaram seus extratos por técnicas de separação para identificar espécies de arsênio, porém, nos materiais utilizados por eles também não apresentavam as concentrações individuais das espécies. Mesmo assim, observa-se que MAE pode ser uma alternativa promissora para a extração e posterior especificação química.

2.4. Especificação e química analítica

Como foi apresentado anteriormente, diferentes estados de oxidação, composições isotópicas e estruturas moleculares de um mesmo elemento químico são consideradas espécies individuais. As metodologias de análise utilizadas na especificação química de um sistema produzem um perfil de espécies suficientemente diferentes e mensuráveis para o nível desejado de compreensão do comportamento do sistema. Vários aspectos contribuem para a identificação de espécies para um elemento particular, e podem diferir em importância, dependendo das razões pelas quais uma especificação foi realizada e das áreas de interesse, como meio ambiente, química, geoquímica, bioquímica e toxicologia [1]. Também foi ressaltado que diferentes espécies podem ter diferentes atuações no organismo [2,3,7], tornando necessário a identificação e quantificação dessas espécies individualmente. É importante ainda destacar que análise de especificação é atividade da química analítica que busca a identificação e quantificação de uma ou mais espécies de um elemento químico em um sistema, enquanto especificação é a distribuição de um elemento químico em suas espécies em um sistema, isto é, é o resultado da análise de especificação [1]. Para realizar a análise de especificação e posterior especificação, diferentes estratégias analíticas vêm sendo desenvolvidas, desde extrações e pré-concentrações até acoplamento de diversas técnicas analíticas.

Sussulini *et al.* [42], utilizaram a extração por ponto núbem para extrair e pré-concentrar cromo hexavalente em amostra de água, após a sua complexação com difenilcarbazida, diminuindo sua hidrofiliabilidade. Com a adição do surfactante Triton X-114, cloreto de sódio e aquecimento, ocorria a separação de fases e o complexo metálico migrava para a fase rica em surfactante e, após a sua separação da fase pobre em surfactantes

(aquosa), a mistura era diluída em uma solução de HNO_3 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e etanol a 5% (v/v), na proporção 1:9 e analisada em um espectrômetro de absorção atômica com chama.

Lopes *et al.* [43], utilizaram uma fibra de PMDS/DVB utilizada para SPME para extrair espécies organoestanho voláteis (dibutilestanho e tributilestanho), enquanto realizava a análise de estanho total em sedimento marinho utilizando um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Tetraetilborato de sódio era adicionado juntamente com a amostra dentro de forno de grafite, fazendo a derivatização *in situ* das espécies, aumentando sua volatilidade. Após a extração durante a análise de estanho total, a fibra era levada a um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) para identificação e quantificação das espécies e butilestanho.

Algumas vezes, técnicas de separação são combinadas *on line* com técnicas de espectrometria atômica para análise de especiação. Desta forma, Salgado *et al.* [41] uniram a técnica de cromatografia líquida com derivatização pós coluna para gerar hidretos com espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (HPLC-HG-ICP OES) para análise de espécies de $\text{As}_i(\text{III})$, DMA, MMA e $\text{As}_i(\text{V})$ em algas. Koellensperger *et al.* [44] uniram cromatografia líquida e eletroforese capilar com espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS e CE-ICP-MS) para análise de $\text{As}_i(\text{III})$, $\text{As}_i(\text{V})$, DMA, MMA, AB e AC em solo contaminado com arsênio. Duester *et al.* [45] acoplaram a técnica de separação de cromatografia a gás espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (GC-ICP-MS) para análise de espécies metiladas de arsênio, estanho e antimônio em solos, derivatizando as espécies com THB antes da injeção.

Outra técnica que vem sendo utilizada é o Aprisionamento Criogênico (em inglês, *Criotrapping*), que consiste no congelamento dos hidretos em nitrogênio líquido, com uma posterior evolução dos hidretos, controlando a temperatura de acordo com seus respectivos pontos de ebulição (técnica denominada CT-HG-AAS). Musil *et al.*[46], utilizaram essa técnica para a análise de espécies inorgânicas metiladas de arsênio. Utilizando um sistema de injeção em fluxo, a amostra era misturada com THB, e, após a remoção dos hidretos em um separador gás-líquido, estes eram levados para um tubo em “U” imerso em nitrogênio líquido, onde eram congelados. Após a remoção do nitrogênio, pela diferença dos pontos de ebulição do arsano, metilarsano e dimetilarsano, estes eram sequencialmente levados até um espectrômetro de absorção atômica, onde eram quantificados. Para a análise das espécies

pentavalente, ácido tioglicólico e L-cisteína foram empregados para a pré-redução e o procedimento foi repetido.

3. OBJETIVOS:

1 – Avaliar um sistema de injeção em fluxo com geração de hidretos e atomizar de forno metálico na espectrometria de absorção atômica para análise de especiação de arsênio inorgânico;

2 – Viabilizar a extração assistida por micro-onda em frascos fechados com técnica de preparo de amostra para análise de especiação de arsênio inorgânico.

4. PARTE EXPERIMENTAL:

4.1. *Materiais e Reagentes:*

4.1.1. Reagentes:

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ($\rho \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Millipore, EUA). Como fonte de $\text{As}_i(\text{III})$, foi utilizado uma solução de Arsenito de Sódio (Na_3AsO_3 - Riedel) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($3746,1 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{As}_i(\text{III})$); como fonte de $\text{As}_i(\text{V})$, Hidrogenoarsenato de sódio heptaidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 99,998% Aldrich), na concentração de 1000 mg L^{-1} de $\text{As}_i(\text{V})$, dissolvido em solução de ácido clorídrico (HCl 36% Merck) 2%(v/v). Essas soluções foram utilizadas tanto para os testes de otimização quanto nas extrações, juntamente com materiais certificados de plâncton (BCR414). Foi utilizada solução de Tetraidridoborato(1-) de sódio (NaBH_4 98% Aldrich) preservada em hidróxido de sódio (NaOH 98% Sigma Aldrich) à 0,05% (m/v) como agente redutor. Ácido cítrico anidro (99,5% Synth), foi utilizado para a preparação do tampão pH 4,5, neutralizado com NaOH. Uma série de pré-redutores foram testados para avaliar a eficiência de redução do $\text{As}_i(\text{V})$ a $\text{As}_i(\text{III})$: iodeto de potássio (KI 99% Nuclear) combinado com ácido ascórbico (99,7% Merck); cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 99% Merck); tiosulfato de sódio anidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 98% Fluka); L-cisteína (99% Aldrich); tiouréia (99% Synth).

Ferrocianeto de potássio triidratado ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 99% Aldrich) e ferricianeto de potássio anidro ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 99,3% J.T. Baker) foram utilizados para preparar o padrão 228mV para o eletrodo de Pt/Ag/AgCl na concentração de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para cada sal, dissolvidos em um tampão contendo fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, preparado pela mistura equimolar de diidrogenofostato de potássio (KH_2PO_4 99,4% J. T. Baker) e monoidrogenofostato de potássio (K_2HPO_4 99,5% J. T. Baker) e o pH ajustado para 7 com solução de NaOH 1 mol L^{-1} .

Soluções tampão comerciais fosfato pH 7 e ftalato pH 4 (Quemis – Brasil) foram utilizadas para a calibração do eletrodo de pH.

A liga Inconel 600® (Camacam ligas especiais customizadas – São Paulo-SP – Brasil), composição min. 72,0% de Ni, 14,0-17,0% de Cr e 6,0-10,0% de Fe, foi utilizado para a confecção do tubo metálico usado como atomizador.

Os materiais certificados NIST1643e – Traço de elementos em água e BCR414 – Plancton, foram utilizados neste trabalho. Suas cartas de certificação estão apresentadas nos Anexos I e II, respectivamente.

4.1.2. Equipamentos:

Para os testes de extração foi utilizado forno de micro-onda Provecto, tipo cavidade. Para as determinações de $As_i(III)$ e As_i total ($As_i(III) + As_i(V)$), foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama, Analyst 300, marca Perkin Elmer, com uma lâmpada de EDL de arsênio, em um comprimento de onda de 193,7 nm e corrente de 300 mA, grade de difração de 180 à 400nm, e uma lâmpada de deutério como corretor de fundo. Foi acoplado ao espectrômetro um sistema de geração de hidreto, empregando um injetor comutador e uma bomba peristáltica Ismatec modelo IPC, e atomizador metálico (liga Inconel 600®) sobre uma chama de ar:acetileno. Para a determinação de arsênio total ($As_i(III)+As_i(V)+organoarsênios$), foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) AA600 Perkin Elmer, utilizando uma plataforma com aquecimento transversal, modificador de matriz composto por paládio e nitrato de magnésio e corretor de fundo Zeeman, e o programa de análise sugerido pelo fabricante (Vide Tabela 2).

Tabela 2: Programa para análise de As em GF AAS sugerido pelo fabricante Perkin Elmer

Etapa	Temperatura (°C)	tempo (s)		Vazão de Ar (mL min ⁻¹)	
		rampa	Patamar		
1	Secagem 1	110	1	30	250
2	Secagem 2	130	15	30	250
3	Pirólise	1200	10	20	250
4	Atomização	2000	0	5	0
5	Limpeza	2450	1	3	250

Para as medidas dos potenciais das soluções, um potenciômetro Digimed DM20 foi utilizado juntamente com um eletrodo combinado de platina com referência prata/cloreto de prata e eletrólito interno gel de cloreto de potássio saturado. Para os ajuste de pH dos tampões, o mesmo potenciômetro foi utilizado, acoplado a um eletrodo de vidro para medidas de pH.

4.2 Procedimentos:

4.2.1 – Avaliação do Sistema FI-HG-MF-AAS:

Na primeira etapa dessa dissertação, foi verificado um sistema FI-HG-MF-AAS (do inglês *Flow injection - hydride generation - metallic furnace – atomic absorption spectrometry*), para se realizar a determinação de $As_3(III)$. O primeiro sistema testado foi o proposto e otimizado por Klassen *et al.* [29] (Vide Figura 6).

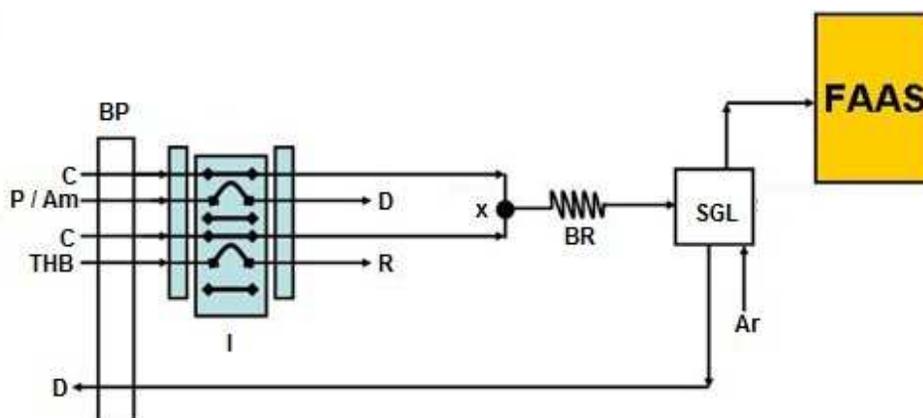


Figura 6: Esquema do sistema de injeção em fluxo, na posição de amostragem. [BP] Bomba Peristáltica; [C] Solução Carregadora; [P/Am] Solução Padrão ou Amostra; [I] Injetor comutador; [THB] Solução de tetraidridoborato(1-) de Sódio; [R] Refluxo da solução de tetraidridoborato(1-) de Sódio; [x] Ponto de Confluência; [D] Descarte; [BR] Bobina de Reação; [SGL] Separador Gás-Líquido; [Ar] Fluxo de Argônio.

Os valores obtidos na otimização desse sistema [29], e que foram utilizados como pontos de partida nesse trabalho de Dissertação encontram-se na Tabela 3:

Tabela 3: Valores otimizados para análise de As por FI-HG-MF-AAS por Klassen *et al.*[29]

Parâmetro avaliado	Resultado otimizado
Volume de solução padrão ou amostra injetada (μL)	1600
Vazão de carregador (mL min^{-1})	11,4
Comprimento da Bobina de Reação (cm)	30
Vazão de Acetileno (L min^{-1})	3
Vazão de Ar (L min^{-1})	10
Vazão de Argônio (mL min^{-1})	86
Concentração da solução carregadora de HCl (mol L^{-1})	1,44
Concentração da solução de NaBH_4 preparada em NaOH 0,8% (m/v) (% (m/v))	0,7
Área total dos furos do tubo de liga Inconel® (mm^2)	42
Vazão de água no nebulizador (mL min^{-1})	2

É importante ressaltar que o tubo de liga Inconel 600® utilizado contém níquel em sua composição. O níquel pode reagir com o arsênio em sua forma atômica na chama, formando espécies como NiAs_2O_6 e $\text{Ni}_3(\text{AsO}_4)_2$, espécies que se volatilizam sem atomizar, suprimindo o sinal analítico para arsênio. Após uma injeção de uma solução contendo 40 mg L^{-1} de arsênio, todo o níquel da superfície do tubo foi consumido, e os sinais para baixas concentrações de arsênio começaram a ser notados [29]. O mesmo ocorreu com Figueiredo *et al.* para a determinação de antimônio pela técnica de FI-HG-MF-AAS, pois formava-se NiSb_2O_4 e NiSb_2O_6 [24]. Esse tratamento de decapagem é feito apenas para um tubo novo.

Outro sistema testado foi uma adaptação do proposto por Gonzalez *et al.* [47], que utilizou um sistema similar, porém com atomizador de tubo de quartzo (QTA). O sistema está apresentado na Figura 7.

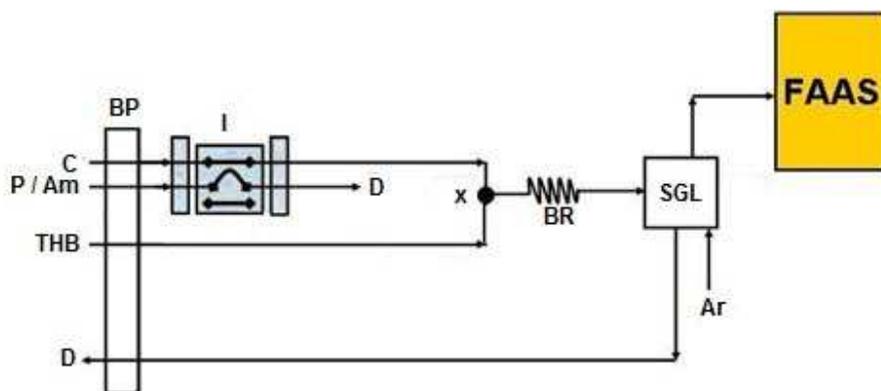


Figura 7: Adaptação do sistema do proposto por Gonzalez *et al.* [47], na posição de amostragem. [BP] bomba peristáltica; [C] solução carregadora; [P/Am] solução padrão ou amostra; [I] injetor comutador; [THB] solução de tetraidridoborato(1-) de sódio; [x] ponto de confluência; [D] descarte; [BR] bobina de reação; [SGL] separador gás-líquido; [Ar] fluxo de argônio.

As condições descritas para o sistema proposto por González *et al.* [47] encontram-se na Tabela 4; sendo que os autores não dão mais nenhum detalhe do sistema proposto.

Tabela 4: Condições propostas por González *et al.* [47].

Parâmetro	Condição otimizada
Carregador	HCl 2% (v/v) ou Tampão citrato (20% (m/v) em ácido cítrico) pH = 4,5
Redutor	NaBH ₄ 0,05% (m/v), preservado em NaOH 0,05% (m/v)
Rotação da bomba peristáltica	100 rpm
Relação vazão carregador: redutor	2:1

Dessa maneira, para utilizar esse sistema apresentado na Figura 7, uma combinação do sistema de Klassen *et al.* [29] e Gonzalez *et al.* [47] foi realizada e otimizou-se os parâmetros de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5: Condições a serem estudadas para o novo sistema FI-HG-MF-AAS

Parâmetro	Condições ou faixas a serem estudadas
Carregador	HCl 2% (v/v) e ar
Meio diluente para padrões/amostra	HCl 2% (v/v) e Tampão citrato (20% (m/v) em ácido cítrico) pH = 4,5
Vazão de carregador	3,5 – 17,4 mL min ⁻¹
Comprimento da bobina de reação	30 – 120 cm
Concentração de redutor tetraidridoborato(1-) (THB)	0,05 – 0,3 % (m/v)
Vazão de ar na chama	7,0 – 11,0 L min ⁻¹
Vazão de acetileno na chama	2,0 – 4,0 L min ⁻¹
Vazão de argônio no separador gás-líquido	88-160 mL min ⁻¹

Para determinar $As_i(V)$ e As_i total, foram estudados pré-redutores apresentados na literatura, sendo que $As_i(V)$ foi considerado a diferença entre As_i total e $As_i(III)$.

4.2.2 – Avaliação da Extração Assistida por Micro-onda:

Nessa etapa do trabalho, foi avaliada a eficiência da extração assistida por micro-onda para a extração de arsênio total, utilizando material certificado de plâncton. Para isso, aproximadamente 100mg do material certificado foi pesada em frascos de Teflon®, adicionado 10 mL de água deionizada e irradiada em forno de micro-onda tipo cavidade em frascos fechados, no programa apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 : Programa utilizado para a extração de arsênio

Etapa	Tempo (min)	Potencia (W)
1	2	200
2	10	800
3	30	0

Depois de esfriar, os extratos foram filtrados, avolumados para 25mL com água deionizada e determinou-se o arsênio total por GF AAS, com o programa de aquecimento apresentado na Tabela 2.

Em seguida, foi realizado estudo da influência da radiação micro-onda nas proporções das espécies inorgânicas de arsênio. Para tal estudo, soluções contendo $As_i(III)$ e $As_i(V)$ passaram pelo mesmo programa extração. Após a extração, utilizou-se o sistema FI-HG-MF-AAS para a determinação de $As_i(III)$ e As_i total, que é obtido adicionando-se um pré-redutor à solução após a extração e analisando-o pelo sistema proposto. $As_i(V)$ foi estimado pela diferença de As_i total e $As_i(III)$.

Na última etapa, foi determinado $As_i(III)$ e As_i total nos extratos de plâncton, após a extração assistida por micro-onda, empregando o sistema proposto. Da mesma maneira, $As_i(V)$ foi determinado pela diferença de As_i total e $As_i(III)$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Inicialmente, testou-se as condições do sistema FI-HG-MF-AAS otimizadas por Klassen *et al.* [29], apresentadas na Tabela 3, que foram repetidas para avaliação do desempenho, utilizando o sistema FI-HG-MF-AAS apresentado na Figura 6. Para isso, uma curva analítica foi obtida com soluções de $As_i(III)$ (Figura 8).

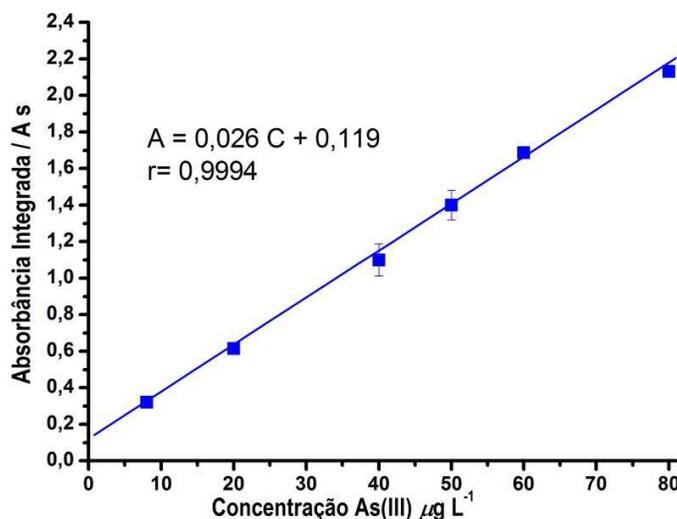


Figura 8: Regressão linear das absorbâncias integradas médias ($n=3$) obtidas no sistema proposto por Klassen *et al.* [29].

Porém, González *et al.* [47] avaliaram que condições próximas às utilizadas por Klassen *et al.* [29] (carregador HCl 10% (v/v), e redutor $NaBH_4$ 0,3% (m/v) preservado em NaOH 0,05%(m/v)) não são eficientes para a especiação de arsênio. Então, foi realizado um teste com as condições de Klassen *et al.* [29] com soluções individuais das espécies $As_i(III)$ e $As_i(V)$ sem pré-redutor para a comparação da resposta analítica obtida para as duas espécies de arsênio inorgânico no sistema apresentado na Figura 6. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

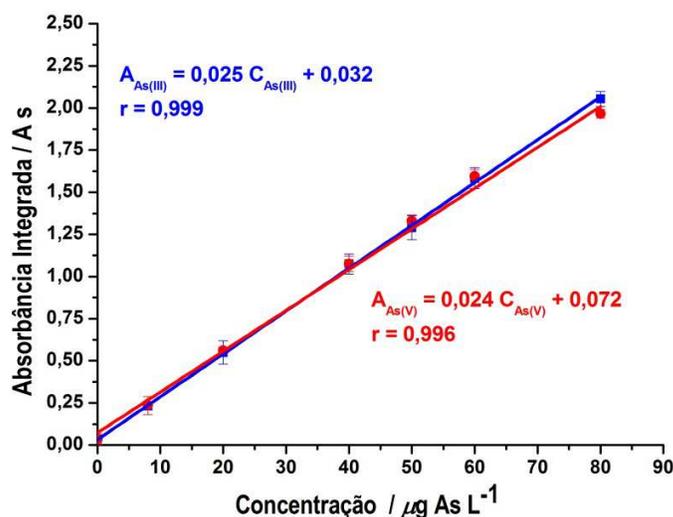
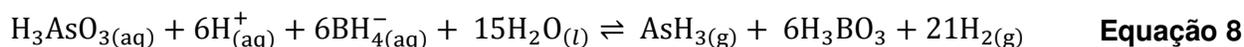


Figura 9: Curvas analíticas (n=3) de As_i(III) e As_i(V) sem pré-redutor nas condições apresentadas na Tabela 3. — As_i(III); — As_i(V).

Aplicando o teste de comparação de médias, observou-se que elas não são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança.

Essa impossibilidade de diferenciação se deve ao fato do próprio Tetraidridoborato(1-) de sódio ser um forte redutor, e, em concentrações tão altas de ácido, pode reduzir o Arsenato a Arsenito. Avaliando a quantidade de matéria adicionada ao sistema em fluxo a cada injeção, considerando o padrão de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a solução de NaBH₄ 0,7%(m/v), 1,6 mL de cada solução representam 128 ng de arsênio ($1,71 \times 10^{-9}$ mol de arsênio) e 11,2 mg de NaBH₄ ($2,96 \times 10^{-4}$ mol de NaBH₄). Observando as estequiometrias da Equação 7 e da Equação 8.



nota-se que para formar um mol de arsano, a partir do ácido arsenoso, são consumidos 6 mol de tetraidridoborato(1-), enquanto partindo-se do ácido arsenico, são consumidos 8 mol de tetraidridoborato(1-). Isso significa que para reagir com a quantidade de arsênio injetada no sistema, são consumidos $1,03 \times 10^{-8}$ mol de tetraidridoborato(1-) para o As_i(III) e $1,37 \times 10^{-8}$ mol para o As_i(V), ficando evidente o excesso do redutor. Com um alto poder redutor do

meio, graças ao excesso de ácido e tetraidridoborato(1-), o $As_i(V)$ acaba sendo convertido a $As_i(III)$.

Após verificar que as condições propostas para o sistema de Klassen *et al.* [29] testou-se o sistema por González *et al.* [47], apresentado na Figura 7 e as condições apresentadas na Tabela 4.

Combinando alguns parâmetros de Klassen *et al.* [29] com González [47], os parâmetros avaliados para esse novo, apresentados na Tabela 5.

Manteve-se do trabalho de Klassen [29] o volume da alça de amostragem, a área total de abertura do tubo metálico e a vazão de água no nebulizador do equipamento de absorção atômica; do trabalho de González [47], manteve-se a configuração do sistema e a preservação da solução de THB e a razão de vazão carregador:THB.

5.1. Otimização do carregador:

Uma curva analítica de $As_i(III)$ de 250 a 2000 $\mu g L^{-1}$ e outra nas mesmas concentrações de $As_i(V)$ foram obtidas utilizando como carregador solução de HCl 2% (v/v). Outra curva analítica, agora de 50 a 500 $\mu g L^{-1}$ de $As_i(III)$ e outra nas mesmas concentrações de $As_i(V)$ foram obtidas utilizando como carregador ar impulsionado pela bomba peristáltica. As curvas obtidas (n=5) encontram-se nas Figura 10 e Figura 11.

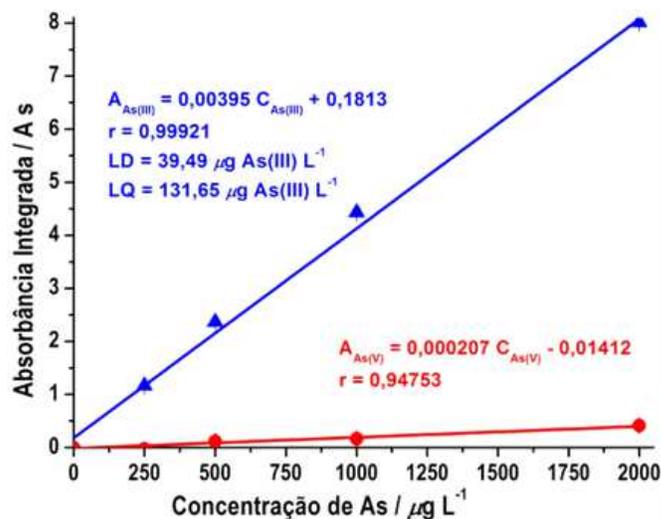


Figura 10: Curvas analíticas obtidas empregando HCl 2% (v/v) como carregador (n=5). Condições fixadas: meio diluente HCl 2% (v/v); vazão de 7,2 mL min⁻¹; bobina de 30 cm; THB 0,05% (m/v); a vazão de ar na 10 L min⁻¹ e de acetileno de 3,0 L min⁻¹ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min⁻¹; volume injetado de 1,6 mL. — As_i(III); — As_i(V).

As barras de erro (estima do desvio padrão) não aparecem na Figura 10, pois ficaram muito pequenas frente à própria Figura.

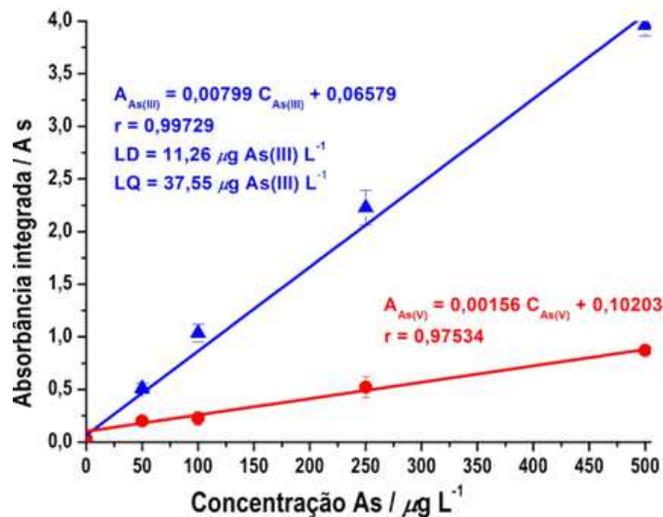


Figura 11: Curvas analíticas obtidas empregando ar como carregador (n=5). Condições fixadas: meio diluente HCl 2% (v/v); vazão de 7,2 mL min⁻¹; bobina de 30 cm; THB 0,05% (m/v); vazão de ar na chama de 10 L min⁻¹; a de acetileno de 3,0 L min⁻¹ e a vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min⁻¹; volume injetado de 1,6 mL. — As_i(III); — As_i(V).

Comparando as Figura 10 e Figura 11, nota-se uma maior sensibilidade utilizando ar como carregador. Isso se deve ao HCl diluir o THB em linha, e também promover sua decomposição antes da reação de geração de arsano.

No entanto, observa-se na Figura 11 que para concentrações maiores de $As_i(V)$ obtêm-se um sinal um pouco maior. Isso pode ser explicado também pela concentração de THB, que sendo menos diluído e decomposto em linha, pode se apresentar em concentrações favoráveis para pré-reduzir o $As_i(V)$ a $As_i(III)$ e formar arsano, como podemos observar na Equação 7 e na Equação 8 apresentadas anteriormente. Também utilizar ar como carregador diminui a dispersão da zona de amostragem devido à presença de bolhas antes e depois da mesma, transformando-se em um sistema mono segmentado [48,49].

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [50]. Utilizando ar como carregador, obtivemos valores menores para estes, pois o seu cálculo está relacionado diretamente com a sensibilidade do método.

Assim, o emprego de ar como carregador aumentou a sensibilidade do método e melhorou os limites de detecção e quantificação, sendo, por isso, utilizado nos demais estudos como carregador.

5.2 Otimização do meio diluente dos padrões e amostras

Para a avaliação da solução de HCl 2% (v/v) como meio diluente dos padrões e ar como carregador, os resultados são os mesmo apresentados na Figura 11.

Uma curva analítica com concentrações de $As_i(III)$ entre 20 a 100 $\mu g L^{-1}$ e outra nas mesmas concentrações de $As_i(V)$ foi obtida empregando tampão citrato pH=4,5 como meio diluente. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 12.

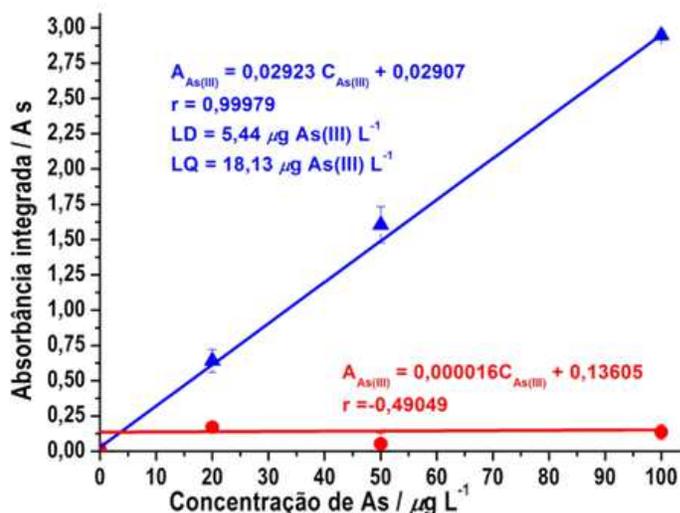


Figura 12: Curvas analíticas obtidas empregando tampão citrato pH 4,5 como meio diluente (n=5). Condições fixadas: carregador ar; vazão de 7,2 mL min⁻¹; bobina de 30 cm; THB 0,05% (m/v); vazão de ar de 10 L min⁻¹ e de acetileno de 3,0 L min⁻¹ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min⁻¹; volume injetado de 1,6 mL. — As_i(III); — As_i(V).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme apresentado na de acordo com as recomendações da IUPAC [50].

Observando a Figura 12, nota-se uma sensibilidade muito maior para a curva empregando tampão citrato pH 4,5 (20% (m/v) de ácido cítrico, ca. 1,04 mol L⁻¹ de ácido cítrico) como meio diluente quando comparada com a curva apresentada na Figura 11. Isso é resultado da maior força iônica do meio. O ácido cítrico tem o pK_{a2} = 4,66, e, por isso, no pH 4,5 podemos considerar apenas o equilíbrio apresentado na Equação 9



onde "Cit" representa o ânion citrato.

Como em pH 4,5 temos $[\text{H}^+] = 3,16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e considerado que $[\text{H}_2\text{Cit}^-] + [\text{HCit}^{2-}] = 1,04 \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}^+] = [\text{H}_2\text{Cit}^-] + 2[\text{HCit}^{2-}]$, temos $[\text{H}_2\text{Cit}^-] = 0,61 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{HCit}^{2-}] = 0,43 \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}^+] = 1,47 \text{ mol L}^{-1}$. A fórmula utilizada para calcular a força iônica está apresentada na Equação 10

$$\mu = \frac{1}{2} \sum [\text{A}](z_{\text{A}})^2 \quad \text{Equação 10}$$

onde $[A]$ representa a concentração de equilíbrio da espécie “A” e z_A é a carga da espécie “A”.

Com isso, temos uma força iônica de $1,9 \text{ mol L}^{-1}$ para a solução tampão citrato pH 4,5; para a solução HCl 2,0 % (v/v) ($0,24 \text{ mol L}^{-1}$, que implica em $[H^+] = [Cl^-] = 0,24 \text{ mol L}^{-1}$), a força iônica é de apenas $0,24 \text{ mol L}^{-1}$, ca. 8 vezes menor que a do tampão. Ellis *et. al.* [51] observaram que com o aumento da força iônica, obtêm-se uma maior evolução de arsano do meio aquoso (efeito *Salting-out*). Além disso, com o aumento do pH (tampão pH = 4,5; HCl 2% (v/v) pH = 0,62), é esperado uma menor formação de H_2 pela decomposição do THB, diluindo-se menos o arsano na fase gasosa.

Observando ainda a Figura 12, vemos que o As(V) não apresentou sinal em pH 4,5. Isso se deve ao fato de todo o As(V) se encontrar como $H_2AsO_4^-$, enquanto que em pH 0,62 ele ainda se encontra ca. 97,6 % na forma H_3AsO_4 e 2,4% na forma de $H_2AsO_4^-$ (vide Figura 13). Observando a Equação 7 vemos que a espécie reativa com tetraidridoborato(1-) é a espécie molecular H_3AsO_4 . O As(III), por outro lado, ainda se encontra como espécie molecular H_3AsO_3 (vide Figura 14).

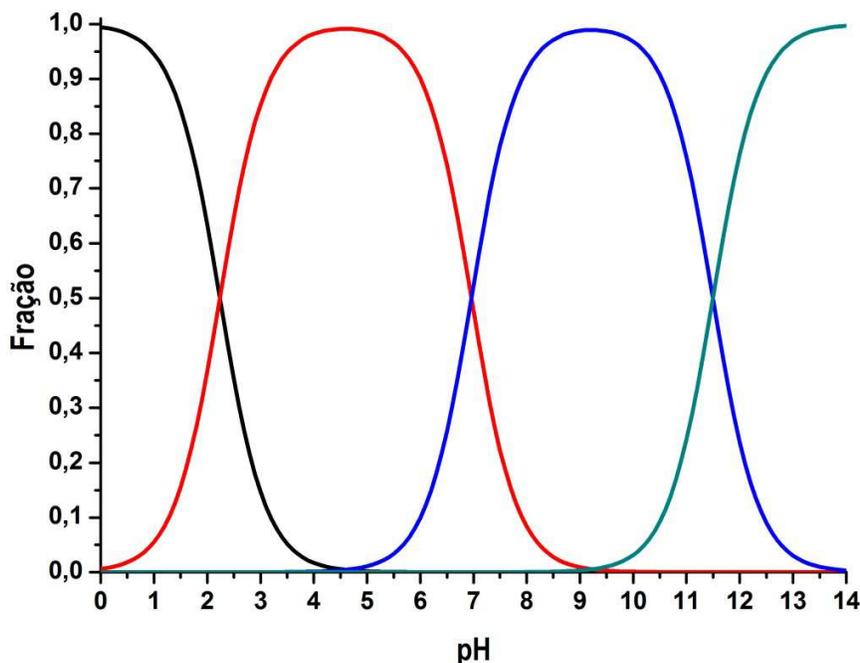


Figura 13: Distribuição teórica das espécies em equilíbrio em função do pH para As_i(V), calculado nesta dissertação à partir dos respectivos pKa's do ácido arsênico: — H_3AsO_4 ; — $H_2AsO_4^-$; — $HAsO_4^{2-}$; — AsO_4^{3-} .

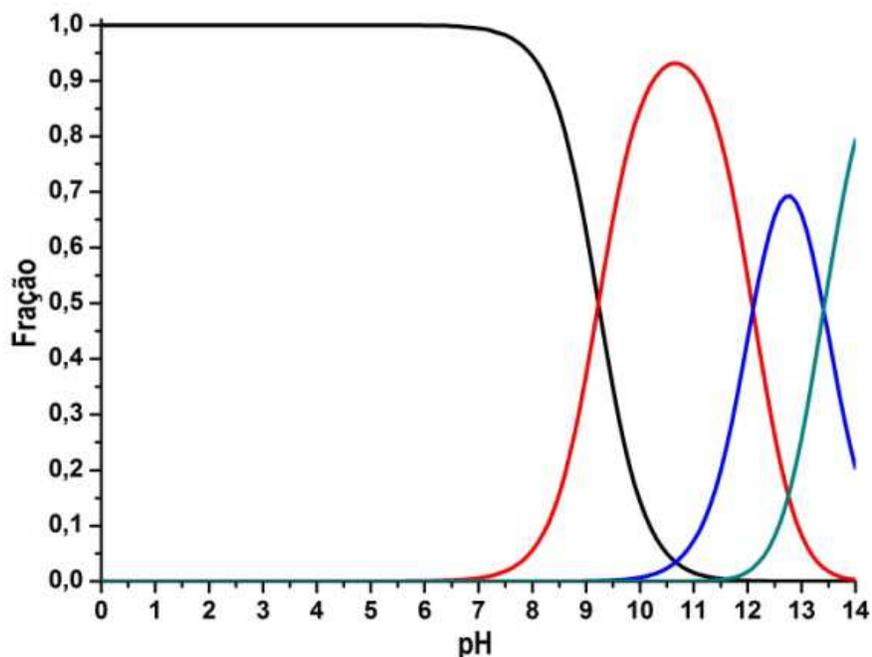


Figura 14: Distribuição teórica das espécies em equilíbrio em função do pH para As(III), calculado nesta dissertação à partir dos respectivos pKa's do ácido arsenoso: — H_3AsO_3 ; — H_2AsO_3^- ; — HAsO_3^{2-} ; — AsO_3^{3-} .

A Figura 15 apresenta o mecanismo de geração de arsano a partir do ácido arsenico, adaptado do proposto por D'Ulivo *et al.* [52].

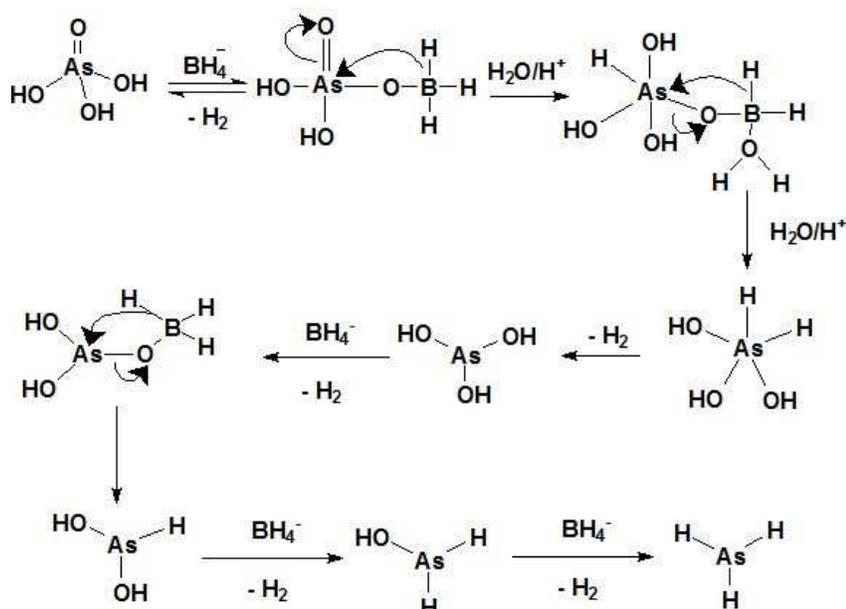


Figura 15: Mecanismos de geração de arsano à partir do ácido arsenico, adaptado do proposto por D'Ulivo *et al.* [52].

Observando a Figura 15, nota-se que o início do mecanismo de redução do ácido arsênico é a condensação deste com o THB; a remoção do próton deve dificultar a tal condensação, pois as cargas negativas geradas devem se repelir. Além disso, com uma baixa concentração de THB, a probabilidade que ocorram colisões entre as duas espécies diminui.

Ainda observando a Equação 7, vemos que a redução de $As_i(V)$ para $As_i(III)$ é também dependente do pH (vide Figura 16).

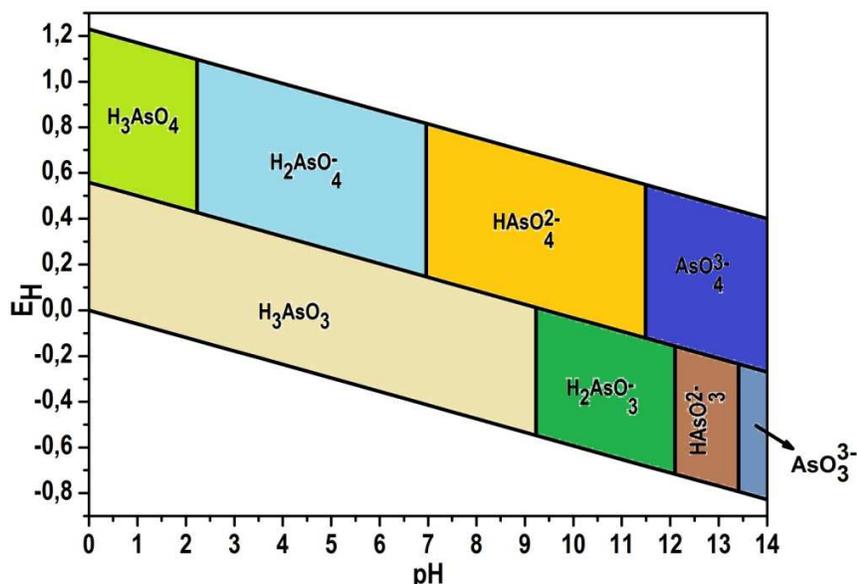


Figura 16: Diagrama E_H x pH teórico para as espécies de arsênio inorgânico, calculado nesta dissertação à partir dos respectivos pK_a 's dos ácidos arsênico e arsenoso e do potencial padrão de oxirredução entre eles

Observando a Figura 16, vemos que o potencial de equilíbrio (potencial quando as concentrações são iguais) da reação de oxirredução do arsênio se altera com o aumento de pH, necessitando de redutores mais poderosos para ser reduzido $As_i(V)$ a $As_i(III)$.

Com o que é demonstrado pelas Figura 13 e Figura 16, em pH 4,5 as condições para que ocorra a reação apresentada na Equação 7 são totalmente desfavoráveis pelos equilíbrios ácido-base e redox.

Com base em todos esses dados, conclui-se que o tampão citrato pH 4,5 é o meio mais adequado para a especiação de arsênio.

5.3. Otimização da vazão do carregador:

Utilizando como meio diluente tampão citrato e ar como carregador, determinou-se a melhor vazão de bombeamento, injetando uma solução de $\text{As}_2(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Inicialmente foi feito um teste mais amplo, medindo-se o sinal analítico nas vazões 3,5, 7,2, 10,6, 14,4 e 17,4 mL min^{-1} . Foi observado um maior sinal para a vazão de 7,2 mL min^{-1} , porém, não ocorria o retorno do sinal à linha base. Já a vazão de 10,6 mL min^{-1} ocorria o retorno do sinal à linha base, porém com uma menor absorvância integrada. Então, foi feito um ajuste fino, com medidas em 8,1, 9,0 e 9,9 mL min^{-1} . Os resultados estão apresentados na Figura 17.

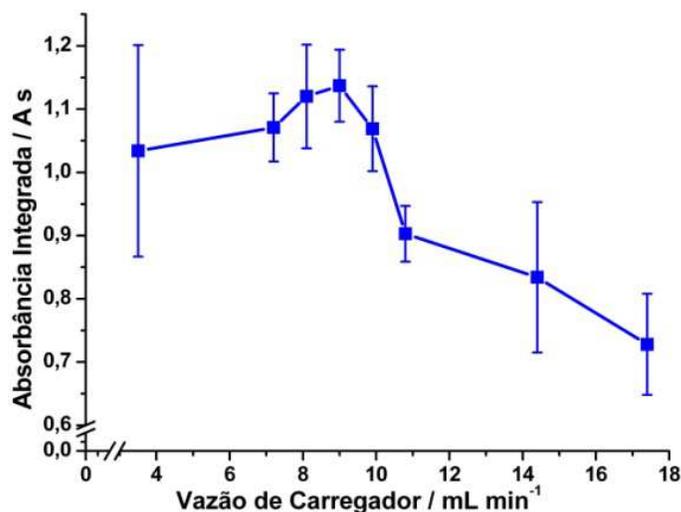


Figura 17: Sinal analítico médio ($n=5$) para um padrão de $\text{As}_2(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função da vazão do carregador. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão citrato pH 4,5; bobina de 30 cm; THB 0,05% (m/v); vazão de ar de 10 L min^{-1} e de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min^{-1} ; volume injetado de 1,6m L.

O sinal analítico aumenta como aumento da vazão até $9,0 \text{ mL min}^{-1}$, pois, provavelmente, a baixa vazão fazia com que a reação ocorresse antes de todo o volume injetado atingisse o separador gás-líquido, diminuindo a eficiência do transporte dos gases até o tubo metálico durante a janela de leitura do espectrômetro de absorção atômica (ca. 1 minuto). Após o valor de $9,0 \text{ mL min}^{-1}$, o sinal começa a cair, pois a alta vazão faz com que o volume de padrão injetado não atinja o separador gás-líquido na maior eficiência de reação, tendo menos arsano produzido para ser levado ao tubo metálico.

Embora $9,0\text{ mL min}^{-1}$ apresentou o maior sinal, o valor de vazão ótima foi o de $9,9\text{ mL min}^{-1}$, pois este apresentava um retorno mais rápido do sinal a linha base, apresentando a melhor compromisso entre o sinal analítico e o desenvolvimento da reação (vide Figura 18).

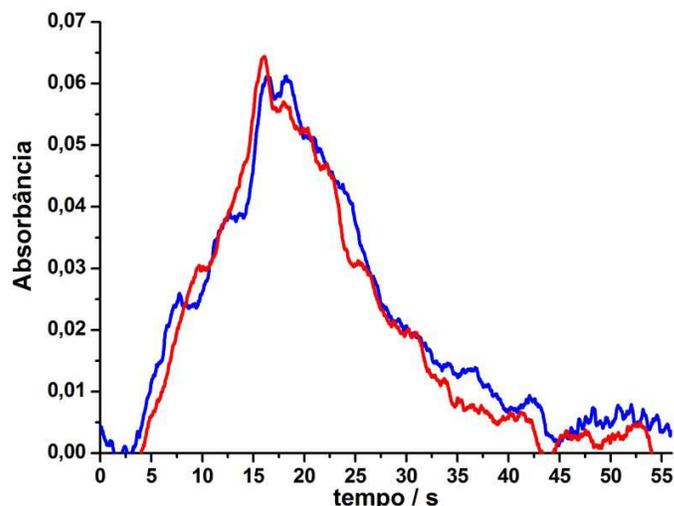


Figura 18: Absorbância em função do tempo de leitura para as vazões: — $9,0\text{ mL min}^{-1}$; — $9,9\text{ mL min}^{-1}$.

5.4. Otimização do comprimento da bobina de reação

Utilizando ar como carregador, tampão citrato pH 4,5 e a uma vazão de carregador de $9,9\text{ mL min}^{-1}$, injetou-se um solução de $\text{As}_i(\text{III})$ $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ no sistema variando o comprimento da bobina de reação. Os comprimentos testados foram 30, 60, 90 e 120 cm. Os resultados estão apresentados na Figura 19.

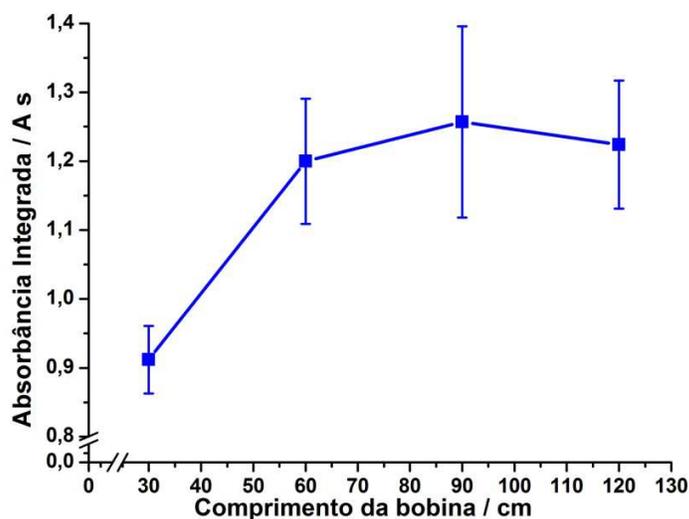


Figura 19: Sinal analítico médio ($n=5$) para um padrão de $\text{As}_i(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função do comprimento da bobina de reação. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão citrato pH 4,5; vazão de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$; THB 0,05% (m/v); vazão de ar de 10 L min^{-1} e de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min^{-1} ; volume injetado $1,6 \text{ mL}$.

Embora a bobina de 90 cm apresentou o maior sinal médio (1,257 A s), também houve uma maior dispersão de resultados (estimativa do desvio padrão - $\sigma_{n-1} = 0,139$). As bobinas de 60 e 120 cm apresentaram sinais médios (1,200 e 1,224 A s, respectivamente) e dispersão de resultados (estimativa do desvio padrão - σ_{n-1} de 0,091 e 0,093, respectivamente) na mesma ordem, porém, a bobina de 120 cm apresentou menor ruído pois chegou-se a uma condição mais homogênea, sendo esta escolhida para dar continuidade ao trabalho.

5.5. Otimização de concentração de tetraidridoborato(1-) (THB) de sódio

Utilizando ar como carregador, tampão citrato pH 4,5, a uma vazão de carregador de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$ e uma bobina de reação de 120 cm, injetou-se um solução de $\text{As}_i(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ no sistema variando a concentração da solução de THB. As concentrações testadas foram 0,05, 0,10, 0,20 e 0,30 % (m/v), preservadas em NaOH 0,05 % (m/v) e bombeadas à metade da vazão do carregador. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

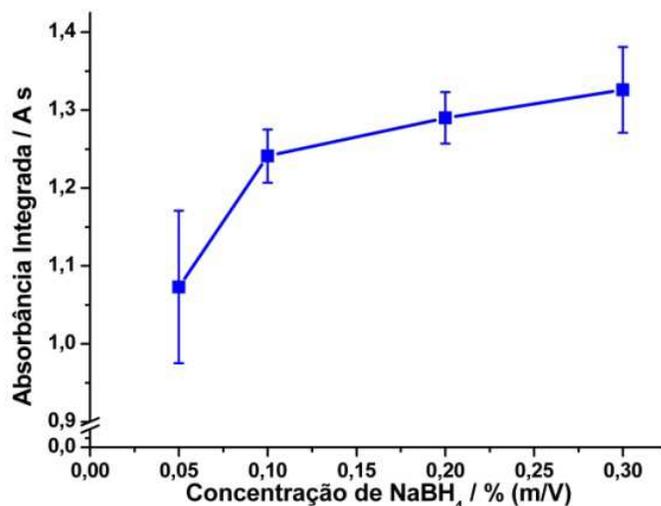


Figura 20: Sinal analítico médio ($n=5$) para um padrão de $\text{As}_2(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função da concentração de THB. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão citrato pH 4,5; vazão de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$; bobina de 120 cm ; a vazão de ar de 10 L min^{-1} e de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min^{-1} ; volume injetado $1,6 \text{ mL}$.

Apesar da concentração de $0,30 \%$ ter apresentado o maior sinal, o perfil do sinal apresentado não era adequado (vide Figura 21).

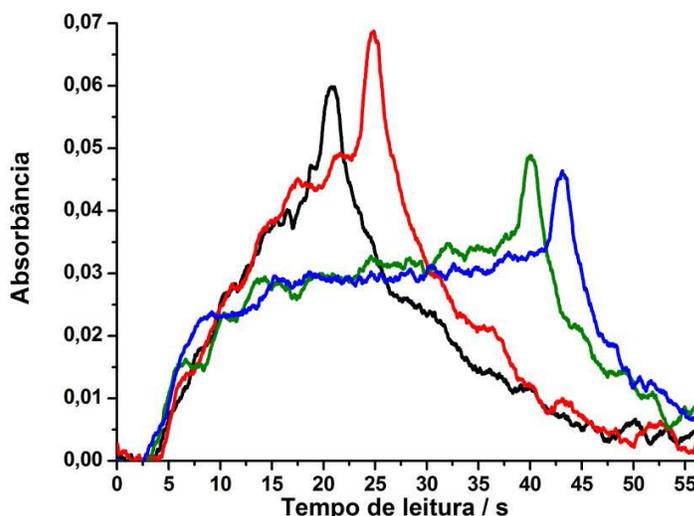


Figura 21: Absorbância em função do tempo de leitura para cada uma das concentrações de THB testadas: — $0,05\%(m/v)$; — $0,10\%(m/v)$; — $0,20\%(m/v)$; — $0,30\%(m/v)$;

Esse comportamento para as concentrações de $0,20$ e $0,30 \%$ deve-se ao fato do excesso de THB decompor-se, aumentando a quantidade de H_2 gasoso na bobina, causando um aumento de pressão, o que causaria uma grande dispersão do fluido na bobina, e,

conseqüentemente, dispersão do arsano formado. Por esse motivo, a concentração de 0,10% foi escolhida como ótima para as próximas etapas.

5.6. Otimização da vazão de ar e acetileno na chama

Utilizando ar como carregador, tampão citrato pH 4,5, a uma vazão de carregador de 9,9 mL min⁻¹, uma bobina de reação de 120 cm e uma solução de THB de 0,10% (m/v), injetou-se um solução de As_i(III) 50 µg L⁻¹ no sistema variando a vazão de ar na chama do equipamento de absorção atômica. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

Observa-se um aumento do sinal e uma diminuição da dispersão de resultados (considerando a estimativa do desvio padrão da média) com um aumento da vazão de ar na chama até o valor de 10 L min⁻¹, o que indica que a concentração de oxidante necessária está atingindo o valor ideal para decomposição e atomização do arsano. A partir do valor de 10 L min⁻¹, observa-se uma ligeira queda do sinal, pois a alta vazão de ar pode remover os átomos de arsênio centro do tubo, ou também começar a formação de As₂O₃ [29], diminuindo a intensidade do sinal analítico.

Utilizando ar como carregador, tampão citrato pH 4,5, a uma vazão de carregador de 9,9 mL min⁻¹, uma bobina de reação de 120 cm, uma solução de THB de 0,10% (m/v) e uma vazão de ar na chama de 10 L min⁻¹, injetou-se um solução de As_i(III) 50 µg L⁻¹ no sistema, variando a vazão de acetileno na chama do equipamento. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

Como pode ser notado pela Figura 23, ocorre um aumento significativo do sinal quando se aumenta a vazão de acetileno na chama de 2,0 para 3,0 L min⁻¹. Entretanto, na vazão de 4,0 L min⁻¹, a dispersão dos resultados (estimativa do desvio padrão) se torna muito alta, não sendo aceitável para um trabalho analítico ($\sigma_{n-1} = 1,24$). Isso se deve ao fato da chama se tornar muito emissiva e redutora com esse aumento na vazão de acetileno, o que não favorece a decomposição térmica do arsano. Os sinais obtidos não passavam de ruído causado pela própria emissividade da chama.

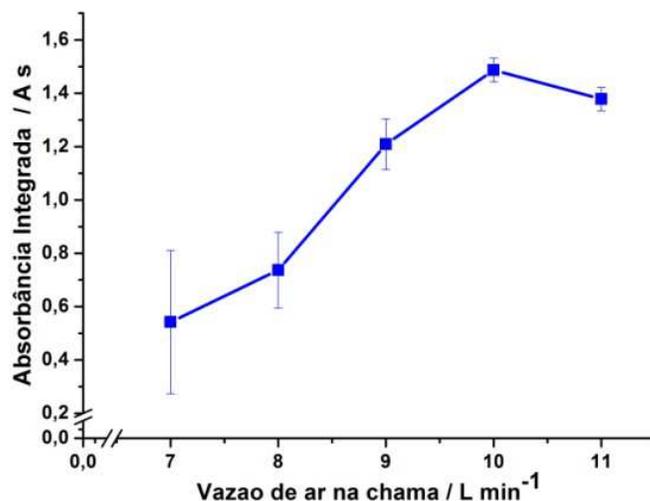


Figura 22: Sinal analítico médio ($n=5$) para um padrão de $As_3(III)$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função da vazão de ar na chama. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão citrato pH 4,5; vazão de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$; bobina de 120 cm ; concentração de THB de $0,10\% \text{ (m/v)}$; vazão de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min^{-1} ; volume injetado $1,6 \text{ mL}$.

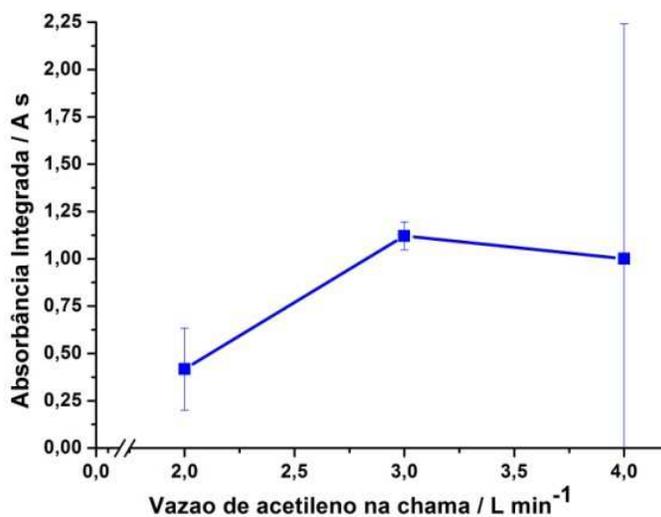


Figura 23: Sinal analítico médio ($n=5$) para um padrão de $As_3(III)$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função da vazão de acetileno na chama, fixando. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão citrato pH 4,5; vazão de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$; bobina de 120 cm ; concentração de THB de $0,10\% \text{ (m/v)}$; vazão de ar em $10,0 \text{ L min}^{-1}$ na chama; vazão de argônio no separador gás-líquido de 88 mL min^{-1} ; volume injetado $1,6 \text{ mL}$.

Como resultado final da composição da chama, obteve-se uma vazão de ar de $10,0 \text{ L min}^{-1}$ e uma vazão de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$. Essa é a mesma composição otimizada por Klassen *et al.* [29], o que demonstra que a rota de atomização do arsano não foi alterada mesmo com as modificações realizadas no sistema até o momento.

5.7. Otimização da vazão de argônio no separador gás-líquido

Utilizando ar como carregador, tampão citrato pH 4,5, a uma vazão de carregador de $9,9 \text{ mL min}^{-1}$, uma bobina de reação de 120 cm, uma solução de THB de 0,10% (m/v) e uma vazão de ar na chama do equipamento de absorção atômica de $10,0 \text{ L min}^{-1}$ e de acetileno de $3,0 \text{ L min}^{-1}$, injetou-se um solução de $\text{As}_i(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ no sistema, variando a vazão de argônio no separador gás-líquido. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

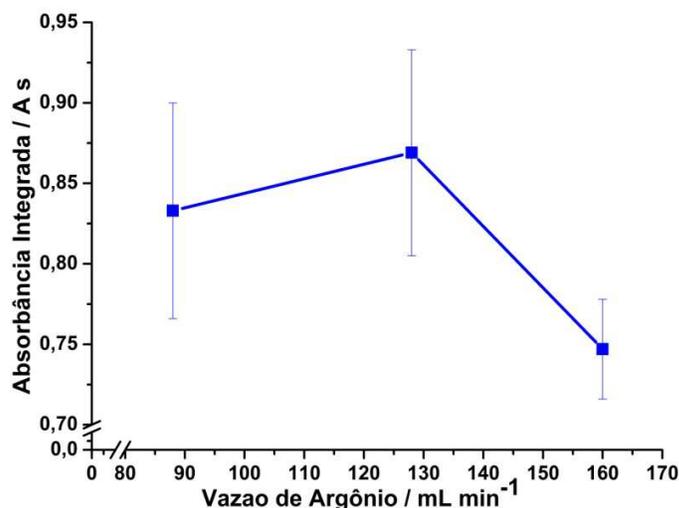


Figura 24: Sinal analítico médio ($n=5$) para padrão de $\text{As}_i(\text{III})$ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em função da vazão de argônio do separador gás-líquido. Condições fixadas: carregador ar; meio diluente tampão pH 4,5; vazão $9,9 \text{ mL min}^{-1}$; bobina 120 cm; THB 0,10% (m/v); ar na chama de $10,0 \text{ L min}^{-1}$ e acetileno $3,0 \text{ L min}^{-1}$; volume injetado 1,6 mL.

Observa-se na Figura 24 que a eficiência de transferência do arsano aumentou quando a vazão de argônio aumentou de 88 para 128 mL min^{-1} , porém, diminuiu quando aumentada para 160 mL min^{-1} . Essa queda deve-se ao fato do arsano não estar em sua totalidade no feixe de radiação. Figueiredo *et al.* [24], também observaram que a temperatura do tubo na região próxima a entrada do capilar diminui em relação à regiões mais afastadas. Isso deve-se ao fato da alta vazão de argônio diminuir a temperatura da região, afetando sua atomização do hidreto. Por isso, o valor otimizado para a vazão de argônio no separador gás - líquido foi fixada em 128 mL min^{-1} .

A Tabela 7 apresenta todas as condições otimizadas para o sistema FI-HG-MF-AAS.

Tabela 7: Condições otimizadas para o novo sistema FI-HG-MF-AAS

Parâmetro	Condição otimizada
Carregador	ar
Meio diluente para padrões/amostra	Tampão citrato (20% (m/v) em ácido cítrico) pH = 4,5
Vazão de carregador	9,9 mL min ⁻¹
Comprimento da bobina de reação	120 cm
Concentração de redutor tetraidridoborato(1-) de sódio (THB)	0,1 % (m/v)
Vazão de ar na chama	10,0 L min ⁻¹
Vazão de acetileno na chama	3,0 L min ⁻¹
Vazão de argônio no separador gás-líquido	128 mL min ⁻¹

5.8. Desempenho analítico

Nas condições otimizadas, uma nova curva analítica foi construída, apresentada na Figura 25.

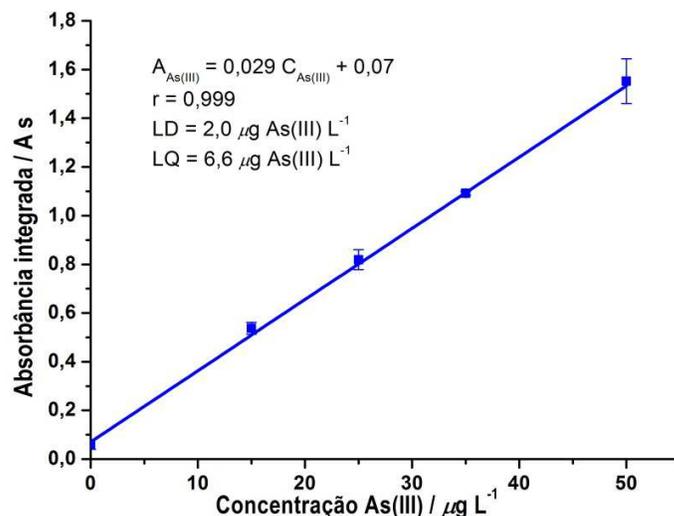


Figura 25: Curva analítica obtida nas condições otimizadas apresentadas na Tabela 7

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [50], sendo de 2,0 e 6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente

Um teste de recuperação, utilizando o material certificado NIST 1643e, Traço de elementos em água, contendo 60,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio total (vide Anexo I), foi realizado,

adicionando a 10 mL da amostra, 10 mL do tampão citrato pH 4,5 (50% (m/v) em ácido cítrico) para ajuste de pH e força iônica e avolumando-se para 25mL com água deionizada. O resultado para esse material certificado foi menor que o limite de detecção do método, que indica que a amostra possui uma baixa concentração de $As_i(III)$.

5.9. Otimização do pré-redutor

Na evidência de ausência de $As_i(III)$ no material, realizou-se um estudo para verificar se seria possível reduzir $As_i(V)$ a $As_i(III)$ no meio de estudo. Para isso, adicionou-se a uma solução de $As_i(V)$ $50\mu g L^{-1}$ preparada em tampão citrato pH 4,5 (20% (m/v) de ácido cítrico), pré-redutores encontrados na literatura: combinação de ácido ascórbico e iodeto de potássio [29], tiosulfato de sódio [53], cloridrato de hidroxilamina [54], L-cisteína [55] e tiouréia [56], e todos sendo analisadas nas condições otimizadas do método. Os resultados estão apresentados na Figura 26.

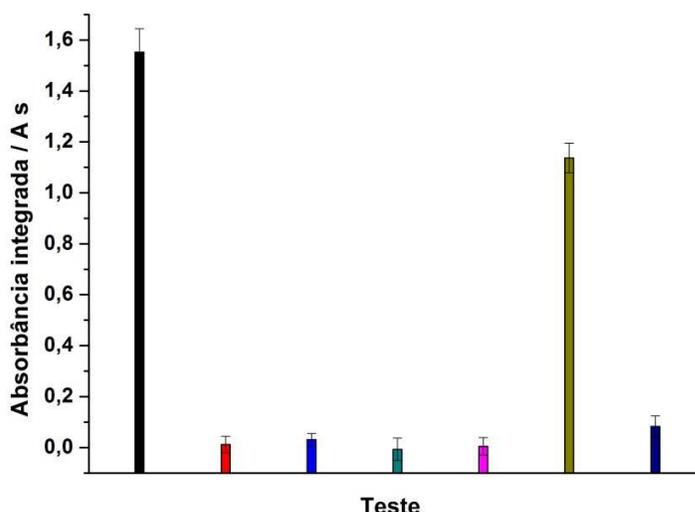


Figura 26: Comparação entre os pré-redutores para o sistema FI-HG-MF-AAS proposto: ■ $As_i(III)$; ■ $As_i(V)$; ■ $As_i(V)$ + KI 2% (m/v) + ác. ascórbico 4%(m/v); ■ $As_i(V)$ + $Na_2S_2O_3$ 2% (m/v); ■ $As_i(V)$ + $NH_2OH.HCl$ 2% (m/v); ■ $As_i(V)$ + L-cisteína 2% (m/v); ■ $As_i(V)$ + tiouréia 2% (m/v).

Como podemos observar na Figura 26, apenas a L-cisteína foi capaz de converter $As_i(V)$ em $As_i(III)$ em pH 4,5 (redução de ca. 72,4%). Os demais redutores apresentaram seus sinais abaixo do limite de quantificação do método.

Os potenciais dos redutores no tampão citrato pH 4,5 foram medidos contra um eletrodo de platina com referência Ag/AgCl. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Potenciais dos redutores em pH 4,5

Redutor	$E^{Pt/Ag/AgCl}$ (mV)	E (V)	Razão [H ₃ AsO ₃]/[H ₃ AsO ₄] (*)	Conc. As _i (III) esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$) (**)
KI 2% (m/v) + Ác. Acorbico 4% (m/v)	-72,0	0,127	$4,41 \times 10^5$	50,00
Na ₂ S ₂ O ₃ 2% (m/v)	76,9	0,276	3,95	39,90
NH ₂ OH.HCl 2% (m/v)	19,7	0,219	$3,43 \times 10^2$	49,85
L-cisteína 2% (m/v)	-120,7	0,078	$1,97 \times 10^7$	50,00
Tiouréia 2% (m/v)	31,6	0,231	$1,36 \times 10^2$	49,63

(*) Valor esperado, calculado de acordo com a Equação 4

(**) Valor esperado, considerando-se concentração de arsênio total de $50 \mu\text{g L}^{-1}$

É interessante observar que, de acordo com os dados apresentados na Tabela 8, com exceção do Na₂S₂O₃, todos os redutores deveriam ser capazes de reduzir praticamente em sua totalidade o As_i(V) para As_i(III). Entretanto, como apresentado na Figura 26, apenas a L-cisteína apresentou essa capacidade. Provavelmente fatores cinéticos, como velocidade de reação, estão impedindo tal redução para os demais redutores, ou a L-cisteína tenha um caráter sinérgico quando associada ao THB, ou até mesmo que a alta afinidade de As_i(III) por grupos sulfidrilas seja tão forte que a própria L-cisteína reduza o As_i(V) para que ocorra essa interação. Gonzalez *et al.* [47], que também utilizaram o tampão citrato pH 4,5 para determinação de As_i(III), utilizaram ácido tioglicólico como pré-redutor, outra molécula que apresenta grupos sulfidrilas em sua estrutura (vide Figura 27)



Figura 27: Estrutura molecular de (a) L-cisteína e (b) ácido tioglicólico

Com o melhor pré-redutor determinado, otimizou-se a concentração de L-cisteína para maximizar a pré-redução de $As_i(V)$ para $As_i(III)$, variando a concentração de pré-redutor de 0,5 até 5,0% ((m/v)). Os resultados estão apresentados na Figura 28.

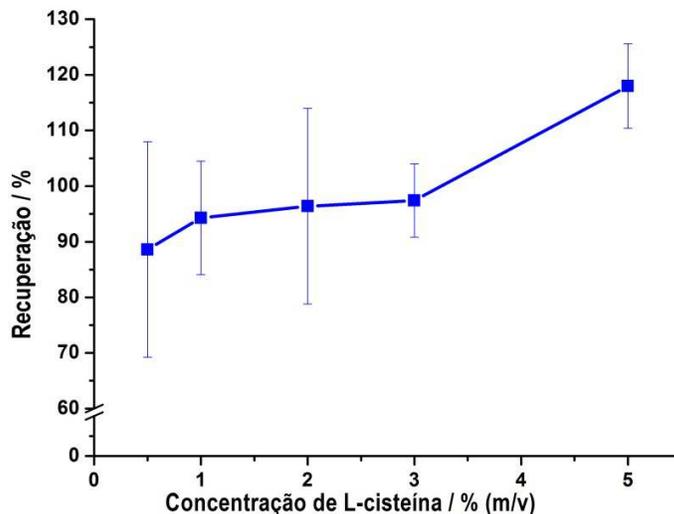


Figura 28: Recuperação média (n=5) para padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de $As_i(V)$ em função da concentração de L-cisteína no meio, nas condições otimizadas apresentadas na Tabela 7.

Como pode ser observado na Figura 28, com o aumento da concentração de L-cisteína, ocorreu um aumento da recuperação, significando um aumento da redução de $As_i(V)$ para $As_i(III)$, porém, as dispersões de resultados também foram altas. É válido lembrar que $As_i(III)$ tem alta afinidade por agrupamentos sulfidrilas[7], presente na molécula de L-cisteína, formando um complexo. A variação da concentração de L-cisteína no meio pode causar alterações na razão de $As_i(III)$ livre : $As_i(III)$ complexada, causando tais dispersões de sinais. A melhor relação redução/dispersão foi para a concentração de 3% (m/v) ($97,4 \pm 6,6$ %). Para a concentração de 5% (m/v), obteve-se uma recuperação de 118 ± 7 %, considerada já muito alta, pois a alta concentração de L-cisteína deve alterar os parâmetros de evolução do arsano, não sendo mais compatível com a curva analítica.

Com a concentração de L-cisteína otimizada, repetiu-se o teste com material certificado NIST1643e, Traço de elementos em água, da mesma maneira descrita no item 5.8. O resultado obtido foi de $60,5 \pm 3,3 \mu\text{g L}^{-1}$, que significa uma recuperação de 100% de As. Isso também significa de 100% do arsênio presente no material certificado NIST1643e é da espécie $As_i(V)$.

5.10. Extração assistida por Micro-onda:

Com o método otimizado, partiu-se para fase de extração assistida por micro-onda. O programa utilizado inicialmente foi o apresentado na Tabela 6.

O material certificado utilizado para esse teste de extração foi o BCR 414, Plâncton. A concentração de arsênio total nesse material é de $6,82 \mu\text{g g}^{-1}$. Para a extração, 100 mg desse material foram pesados em um frasco de PTFE próprio para forno de micro-onda. Foram adicionados 10 mL de água deionizada e aplicado o programa apresentado na Tabela 6. Após resfriar, o extrato foi filtrado e avolumado a 25 mL em um balão volumétrico com água deionizada e esta solução foi analisada em um Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF-AAS) Perkin Elmer AA600 para a determinação do total de arsênio extraído, utilizando o programa de atomização recomendado pelo fabricante (vide Tabela 2). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados da extração de arsênio

Replicata	Massa (g)	Conc. Esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. Obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eficiência de extração (%)
1	0,1008	27,50	25,40	92,4
2	0,1037	28,29	26,30	93,0
3	0,1002	27,33	25,60	93,8

Devido à alta recuperação já observada logo no início, esse programa foi testado para a extração de arsênio para análise de especiação. Para isso, mais 100 mg do material foram submetidos ao programa de extração apresentado na Tabela 5. Soluções de $\text{As}_i(\text{III})$ e $\text{As}_i(\text{V})$ (125 μL de uma solução de 5 mg L^{-1} de cada espécie, equivalente a 625 ng de As, esperando uma concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de As após avolumar) também passaram individualmente pelo mesmo programa para verificar se a radiação micro-onda pode alterar a oxidação das espécies. Após a filtragem, mas antes de avolumar para 25 mL, foram adicionados 10 mL de uma solução tampão pH 4,5 (50% (m/v) de ácido cítrico) para ajustar o pH e a força iônica do extrato com a da curva analítica. Um branco foi realizado com apenas 10 mL de água deionizada. Após análise em triplicada pelo sistema FI-HG-MF-AAS nas condições otimizadas apresentadas na Tabela 6, os resultados para cada replicata de extração foram analisados utilizando tabela ANOVA, com limite de 95% de confiabilidade. Os

resultados observados para a solução de $As_i(III)$ encontram-se na Tabela 10, enquanto o Branco de extração, solução de $As_i(V)$ e extrato do material certificado BCR414 tiveram resultados abaixo do limite de quantificação.

Tabela 10: Resultados obtidos para o padrão de $As_i(III)$ $25 \mu\text{g L}^{-1}$

Replicata	C1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Padrão $As_i(III)$ 1	18,5	23,0	21,3
Padrão $As_i(III)$ 2	18,8	18,5	25,3
Padrão $As_i(III)$ 3	19,4	17,3	21,3

Utilizando a Análise de Variância ANOVA, que todos os resultados são estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança, já que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$.

Na média, a recuperação para o padrão de $As_i(III)$ foi de $81,6 \pm 0,1\%$, enquanto que $As_i(V)$ não foi detectado, por isso, conclui-se que a radiação micro-onda não reduz $As_i(V)$ para $As_i(III)$, mas não podemos confirmar o contrário. Conclui-se, também, que o material BCR414 apresenta uma concentração de $As_i(III)$ inferior à $1,65 \mu\text{g g}^{-1}$, levando-se em consideração o limite de quantificação do método.

O potencial das soluções foi medido após a extração contra um eletrodo de platina com Ag/AgCl como referência para estimar a razão H_3AsO_3/H_3AsO_4 (Vide Equação 4). Os resultados se encontram na Tabela 11. Os procedimentos adotados foram os mesmos descritos anteriormente, incluindo as quantidades de plâncton, $As_i(III)$ e $As_i(V)$.

Tabela 11: Cálculo da razão H_3AsO_3/H_3AsO_4 pelo potencial do meio, utilizando a Equação 4

Solução	pH	$E^{Pt/Ag/AgCl}$ (mV)	E (V)	Razão H_3AsO_3/H_3AsO_4	Conc. $As_i(III)$ esperada ($\mu g L^{-1}$) (*)
$As_i(III)$ em água	1,95	428,2	0,650	$6,14 \times 10^{-07}$	$2,05 \times 10^{-13}$
$As_i(III)$ em tampão	4,50	256,9	0,479	$3,93 \times 10^{-08}$	$1,31 \times 10^{-14}$
$As_i(V)$ em água	2,47	398,1	0,620	$5,87 \times 10^{-07}$	$1,96 \times 10^{-13}$
$As_i(V)$ em tampão	4,50	250,0	0,472	$6,15 \times 10^{-08}$	$2,05 \times 10^{-14}$
Plâncton em água (0,1014g/25mL)	6,15	225,3	0,447	$1,85 \times 10^{-08}$	$6,16 \times 10^{-15}$
Plâncton em tampão (0,1023g/25mL)	4,50	238,1	0,460	$1,71 \times 10^{-07}$	$5,70 \times 10^{-14}$
branco em água	2,78	417,6	0,640	$2,71 \times 10^{-08}$	----
branco em tampão	4,50	266,5	0,489	$3,07 \times 10^{-08}$	----

(*) Valor esperado, considerando-se concentração de arsênio total de $25 \mu g L^{-1}$

Os resultados observados são diferentes dos reportados por Johnson em 1972 [12]. Porém, ainda revela que podem existir discrepâncias entre os valores observados pela equação de *Nernst* e os reais determinados em águas naturais, os quais Johnson atribuiu à presença de algas com capacidade redutora no meio. Mas como a equação de *Nernst* mede apenas parâmetros termodinâmicos, podem existir parâmetros cinéticos para a oxidação do H_3AsO_3 para H_3AsO_4 pela ação do oxigênio do ar que impeçam essa oxidação.

Para verificar-se a presença de $As_i(V)$, bem como a oxidação de $As_i(III)$ à $As_i(V)$ durante a extração, repetiu-se o processo de extração detalhado anteriormente, porém, adicionando-se L-cisteína nos extratos à uma concentração de 3% (m/v) antes das análises. Os resultados encontram-se nas Tabelas Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14.

Tabela 12: Resultados obtidos para o padrão de $As_i(III)$ $25 \mu g L^{-1}$ com L-cisteína

Replicata	C1 ($\mu g L^{-1}$)	C2 ($\mu g L^{-1}$)	C3 ($\mu g L^{-1}$)
Padrão $As_i(III)$ 1	28,5	30,8	28,0
Padrão $As_i(III)$ 2	30,0	26,9	27,3
Padrão $As_i(III)$ 3	22,0	22,8	23,6

Tabela 13: Resultados obtidos para o padrão de $As_i(V)$ $25 \mu g L^{-1}$ com L-cisteína

Replicata	C1 ($\mu g L^{-1}$)	C2 ($\mu g L^{-1}$)	C3 ($\mu g L^{-1}$)
Padrão $As_i(V)$ 1	27,7	26,6	22,0
Padrão $As_i(V)$ 2	28,0	23,6	20,0
Padrão $As_i(V)$ 3	25,4	18,3	24,5

Tabela 14: Resultados obtidos para o extrato de BCR414 com L-cisteína

Replicata	Massa (g)	C1 ($\mu g g^{-1}$)	C2 ($\mu g g^{-1}$)	C3 ($\mu g g^{-1}$)
BCR414-1	0,1011	4,5	3,1	3,2
BCR414-2	0,1012	4,5	4,7	2,9
BCR414-3	0,1015	3,9	3,4	3,8

Os valores foram novamente comparados pela análise de variância ANOVA. Para os resultados obtidos para o $As_i(V)$ (Tabela 13) e extrato de plâncton (Tabela 14), eles podem ser considerados estatisticamente iguais ao nível de 95%. A recuperação de $As_i(V)$ foi na média de $24,0 \mu g L^{-1}$ ($\sigma_{n-1} = 3,4$), representando uma recuperação de cerca 96 %. Para o plâncton, a média foi de $3,8 \mu g g^{-1}$ ($\sigma_{n-1} = 0,7$), o que nos indica que cerca de 55,7% do arsênio presente no material certificado BCR414 é $As_i(V)$.

Para os extratos de $As_i(III)$, a análise de variância ANOVA apresentou $F_{\text{calculado}} > F_{\text{critico}}$. Isso significa que os resultados não pertencem à mesma amostra. Entretanto, comparando apenas os valores obtidos para a primeira e segunda extração (vide Tabela 12, as linhas Padrão $As_i(III)$ 1 e padrão $As_i(III)$ 2), esse valores são estatisticamente iguais ao nível de 95%. Problemas na transferência das soluções nos frascos de PTFE do micro-onda podem ter causado a diferença entres os dois primeiros extratos e o terceiro. Na media das duas primeiras linhas, o valor encontrado foi de $28,6 \mu g L^{-1}$ ($\sigma_{n-1} = 1,5$), representando uma recuperação de 114 ± 6 %. É provável que durante a extração assistida por micro-onda possa ocorrer oxidação de uma parcela de $As_i(III)$, visto que na determinação de $As_i(III)$ no extrato sem a adição de L-cisteína a recuperação foi de $81,6 \pm 0,1$ %.

6. CONCLUSÕES:

A formação de arsano à partir de arsênio pentavalente utilizando tetraidridoborato(1-) ocorre em duas etapas: a primeira é a pré-redução do ácido arsênico (H_3AsO_4) à ácido arsenoso (H_3AsO_3), que na sequência reage novamente com o THB, formando AsH_3 . Utilizando uma solução tampão pH 4,5 pode-se inibir a primeira etapa da reação, pois a espécie prioritária de $As_i(V)$ é o dihidrogenoarsenato ($H_2AsO_4^-$). Essa espécie apresenta uma carga negativa, que deve repelir o THB, que também apresenta carga negativa. Também uma baixa concentração de THB diminui a probabilidade de colisão entre as duas espécies.

O uso do tampão citrato com uma alta concentração melhorou a sensibilidade do método, pois a alta salinidade permite uma melhor evolução do arsano pelo efeito *salting-out*, que permite atingir um limite de quantificação de $6,6 \mu g L^{-1}$, atendendo as necessidades para as análises de potabilidade de águas, uma vez que o VMP de arsênio é $10 \mu g L^{-1}$.

Mesmo modificando-se as características do sistema de injeção em fluxo, a rota de atomização do arsano dentro do tubo de liga Inconel® aquecido sobre a chama de ar:acetileno não foi alterada. Entretanto, variações na composição da chama alteram fortemente a repetibilidade do método.

Apesar de melhorar a seletividade para as espécies de arsênio inorgânico, o uso do pH em 4,5 estabilizou o $As_i(V)$. Apenas com o uso de L-cisteína foi possível uma redução de $As_i(V)$ à $As_i(III)$. Entretanto, a estabilidade do $As_i(V)$ é cinética, ou seja, a L-cisteína deve apresentar um mecanismo diferente de redução, já que medindo-se os potenciais (parâmetro termodinâmico) das soluções contendo os redutores utilizados, apenas o tiosulfato de sódio não seria um redutor muito eficiente.

A concentração de L-cisteína também é crítica, uma vez que esta apresenta um agrupamento sulfidril que tem alta afinidade por $As_i(III)$. Sua concentração pode afetar a relação $As_i(III)$ livre: $As_i(III)$ complexado, que pode afetar a eficiência de formação de AsH_3 .

O uso da extração assistida por micro-onda em frasco fechado apresentou-se uma estratégia interessante para o preparo de amostra para análise de arsênio. Sem o uso de algum ácido ou oxidante, obteve-se uma alta e rápida recuperação de As de uma matriz de plâncton apenas com água, tornando-a interessante quando a concentração de ácido

influenciar a determinação e também pode danificar o equipamento no qual será realizada a determinação.

Em relação ao seu uso para preparo de amostra, a extração assistida por micro-onda em frascos fechados também aparenta ser uma estratégia plausível. Mesmo podendo formar ácidos e peróxido durante o programa de extração, a espécie de $As_i(III)$ não sofreu alteração, pelo menos não foi oxidada completamente. Mesmo as soluções apresentando potenciais nos quais a espécie predominante seria o $As_i(V)$, foi possível detectar e até quantificar $As_i(III)$ em uma solução padrão do mesmo. Contudo, a recuperação foi de cerca de 81%, que indica que uma parte dessa espécie pode ter sido oxidada.

O material utilizado para as extrações (BCR414 – Traço de elementos em plâncton) possui valor de certificação de As de $6,82 \mu g g^{-1}$. Deste total, $6,34 \mu g g^{-1}$, são espécies solúveis de arsênio. A concentração de $As_i(III)$ nesse material é inferior a $1,65 \mu g g^{-1}$, enquanto o $As_i(V)$ apresenta-se na concentração $3,8 \mu g g^{-1}$ (ca. 55,7%). O restante devem ser espécies orgânicas de arsênio (espécies metiladas, arsenoaçúcares), o que abre perspectivas de aprimoramento deste trabalho de Dissertação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS:

[1] D. M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen, R. Łobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000)*, Pure Appl. Chem., 72, pág 1453, **2000**.

[2] A. Baran, E. Bıçak, S. H. Baysal , S. Onal, *Comparative studies on the adsorption of Cr(VI) ions on to various sorbents*, Bioresource Technology, 98, pág. 661, **2006**;

[3] N.K. Lazaridis, C. Charalambous, *Sorptive removal of trivalent and hexavalent chromium from binary aqueous solutions by composite alginate–goethite beads*, Water Research, 39, pág. 4385, **2005**;

[4] M.A.Z. Arruda Ed., *Trends in sample preparation, 1ª edição*, Nova Science Pub Inc, **2007**;

[5] I. A. Katsoyiannis, S. J. Hug , A. Ammann, A. Zikoudi, C. Hatziliontos, *Arsenic speciation and uranium concentrations in drinking water supply wells in Northern Greece: Correlations with redox indicative parameters and implications for groundwater treatment*, Science of the total Environment, 383, pág. 128, **2007**;

[6] D. Wallshläger, J. London, *Determination of methylated Arsenic-Sulfur compounds in groundwater*, Environ. Sci. Technol, 42, pág. 228, **2008**;

[7] B.K. Mandal, K.T. Suzuki, *Arsenic round the world: a review*, Talanta 58, pág 201, **2002**

[8] U.S. Environmental Protection Agency, *Drinking Water Standards and Health Advisories*, **2011**;

(<http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/dwstandards2011.pdf>);

-
- [9] WHO Guidelines for drinking-water quality - 4th ed., **2011**;
(http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf);
- [10] Ministério da saúde Portaria N^o 1.469 Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade, **2001**;
(http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_1469.pdf);
- [11] Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 430, do dia 13 de maio de 2011
(<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>)
- [12] **D.L Johnson**, *Bacterial reduction of arsenate in sea water*, Nature 240, pág 44, **1972**
- [13] **S. Farias, P. Smichowski, D.Vélez, R. Montoro, A. Curtosi, C. Vodopívez**, *Total and inorganic arsenic in Antarctic macroalgae*, Chemosphere 69, pág 1017, **2007**;
- [14] **S. Foster, D. Thomson, W. Maher**, *Uptake and metabolism of arsenate by anoxic cultures of the micro-algae Dunaliella tertiolecta and Phaeodactylum tricornutum*, Marine Chemistry 108, pág 172, **2008**;
- [15] **T. Hayakawa, Y. Kobayashi, X. Cui, S. Hirano**, *A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19*, Arch. Toxicol. 79, pág 183, **2005**;
- [16] **A. D’Ulivo, J. Dedina, Z. Mester, R.E. Sturgeon, Q. Wang, B. Welz**, *Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC technical Report)*, Pure Appl. Chem. 83, pág. 1283, **2011**;
- [17] **N. G. Connelly, R. M. Hartshorn, T. Damhus, A. T. Hutton**, *Nomenclature of Inorganic Chemistry, IUPAC Recommendations (The Red Book)*, **2005**;
-

-
- [18] **J. Dědina, D.L. Tsalev**, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, 1^a edição, Ed. Wiley, **1995**;
- [19] **Z. Slejkovec, E. Kápolna, I. Ipolyi, J. T. van Elteren**, *Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea*, *Chemosphere* 63, pág. 1098, **2006**;
- [20] **I. B. Karadjova, L. Lampugnani, J. Dědina, A. D'Ulivo, M. Onor, D. L. Tsalev**, *Organic solvents as interferences in arsenic determination by hydride generation atomic absorption spectrometry with flame atomization*, *Spectrochimica Acta Part B*, 61, pág. 525, **2006**;
- [21] **T. Näykki, P. Perämäki, J. Kujala, A. Mikkonen**, *Optimization of a flow injection hydride generation atomic absorption spectrometric method for the determination of arsenic, antimony and selenium in iron chloride/sulfate-based water treatment chemical*, *Analytica Chimica Acta*, 439, pág. 229, **2001**;
- [22] **H. Matusiewicz, M. Krawczyk**, *Determination of tellurium by hydride generation with in situ trapping flame atomic absorption spectrometry*, *Spectrochimica Acta Part B*, 62, pág. 309, **2007**;
- [23] **J. Moreda-Piñeiro, C. Moscoso-Perez, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, E. Fernández-Fernández, D. Prada-Rodríguez**, *Multivariate optimization of hydride generation procedures for single element determinations of As, Cd, Sb and Se in natural waters by electro thermal atomic absorption spectrometry*, *Talanta*, 53, pág. 871, **2001**;
- [24] **E. C. Figueiredo, J. Dědina, M. A. Z. Arruda**, *Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectrometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples*, *Talanta*, 73, pág. 621, **2007**;
- [25] **M. L. Brancalion, M. A. Z. Arruda**, *Evaluation of medicinal plant decomposition by TS-FF-AAS*, *Microchim. Acta*, 150, pág 150, **2005**;
-

-
- [26] **A. Gáspár, H. Berndt**, *Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) – a simple method for trace element determination with microsamples in $\mu\text{g/L}$ concentration range*, Spectrochim. Acta part B, 55, pág 587, **2000**;
- [27] **M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. A Z. Arruda**, *Description of thermospray formed at flow rate in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry based on high-speed images*, Anal. Chem., 79, pág. 6527, **2007**;
- [28] **A. S. Ribeiro, M. A. Z. Arruda, S. Cadore**, *A quartz tube atomizer with tungsten coil: a new system for vapor atomization in atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 17, pág. 1516, **(2002)**
- [29] **A. Klassen, E. C. Figueiredo, N. Baccan, M. A. Z. Arruda**, *Metal tube atomizer in hydride generation atomic absorption spectrometry for arsenic determination in animal tissues and sediment*, Br. J. Anal. Chem, 1, pág 110, **2010**;
- [30] **E. C. Figueiredo, J. C. Dias, L. T. Kubota, M. Korn, P. V. Oliveira, M. A. Z. Arruda**, *Influence of microwave heating on fluoride, chloride, nitrate and sulfate concentrations in water*, Talanta 85, Pág. 2707, **2011**;
- [31] **T. Nakazato, M. Akasaka, H. Tao**, *A rapid fractionation method for heavy metals in soil by continuous-flow sequential extraction assisted by focused microwaves*, Anal. Bioanal. Chem., 389, pág. 1663, **2007**;
- [32] **J. H. Borges, L. M. Ravelo-Pérez, E. M. Hernández-Suárez, A. Carnero, M. A. Rodríguez-Delgado**, *Determination of Abamectin Residues in Avocados by Microwave-Assisted Extraction and HPLC with Fluorescence Detection*, Chromatographia, 67, pág 69, **2008**;
- [33] **F. Portet-Koltalo & K. Oukebdane & F. Dionnet & P. L. Desbène**, *Optimisation of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives from diesel*
-

particulate matter using microwave-assisted extraction, Anal Bioanal Chem, 390, pág 389, **2008**;

[34] V. Nischwitz, S. A. Pergantis, *Improved Arsenic speciation Analysis for Extracts of Commercially Available Edible Marine Algae Using HPLC-ES-MS/MS*, J. Agric. Food Chem., Vol. 54, No. 18, pág. 6507, **2006**;

[35] A. Raab, P. Fecher, J. Feldmann, *Determination of Arsenic in Algae – Results of an Interlaboratory Trial: Determination of Arsenic Species in the Water-Soluble Fraction*, Microchim. Acta, 151, pág. 153, **2005**;

[36] S. Karthikeyan, U. M. Joshi, R. Balasubramanian, *Microwave assisted sample preparation for determining water-soluble fraction of trace elements in urban airborne particulate matter: Evaluation of bioavailability*, Analytica Chimica Acta, 576, pág. 23, **2006**;

[37] M. M. Rahman, Z.L. Chen, R. Naidu, *Extraction of arsenic species in soils using microwave-assisted extraction detected by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*, Environ. Geochem. Health, 31, pág. 93, **2009**;

[38] L. Di Palma, R. Mecozzi, *Heavy metals mobilization from harbour sediments using EDTA and citric acid as chelating agents*, Journal of Hazardous Materials, 147, pág. 768, **2007**;

[39] L. H. Reyes, J. L. G. Mar, G. M. M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H. M. S. Kingston, *Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry*, Talanta, 78, pág. 983, **2009**;

[40] J. L. G. Mar, L. H. Reyes, G. M. M. Rahman, H. M. S. Kingston, *Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted*

Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem., 57, pág. 3005, **2009**;

[41] S. García Salgado, M. A. Quijano Nieto, M.M. Bonilla Simon, *Determination of soluble toxic arsenic species in alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–hydride generation–inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1129, pág. 54, **2006**;

[42] A. Sussulini; M. A. Z. Arruda, *Determinação de cromo(VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem*, Eclética Química (Araraquara), 31, pág. 73, **2006**;

[43] A. S Lopes, F. Augusto, M. A. Z Arruda, *The feasibility of coupling Graphite furnace with solid phase microextraction aiming at speciating organotin compounds*. Br, J. Anal. Chem, 4, pág. 201, **2011**;

[44] G. Koellensperger, J. Nurmi, S. Hann, G. Stingeder, W. J. Fitz, W. W. Wenzelb, *CE-ICP-SFMS and HPIC-ICP-SFMS for arsenic speciation in soil solution and soil water extracts*, J. Anal. At. Spectrom. 17, pág. 1042, **2002**;

[45] L. Duester, R. A. Diaz-Bone, .J. Kösters, A. V. Hirner, *Methylated arsenic, antimony and tin species in soils*, J. Environ. Monit., 7, pág. 1186, **2005**;

[46] S. Musil , T. Matoušek, *On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B 63, pág. 685, **2008**;

[47] J. C. González, I. Lavilla, C. Bendicho, *Evaluation of non-chromatographic approaches for speciation of extractable As (III) and As (V) in environmental solid samples by FI-HGAAS*, Talanta 59, pág. 525, **2003**;

-
- [48] **C. Pasquini, W.A.de Oliveira**, *Monosegmented system for continuous-flow analysis - spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorus*, Anal. Chem. 57, pág. 2575, **1985**;
- [49] **W.E. Van der Linden**, *Classification and definition of analytical methods based on flowing media (IUPAC Recommendations 1994)*, Pure Appl. Chem. 66, pág. 2494, **1994**;
- [50] **A. D. McNaught, A. Wilkinson**, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (The Gold Book)*, 2nd Edition, **1997**.
- [51] **R. I. Ellis, N. G. Sundin, J. F. Tyson, S. A. McIntosh, C. P. Hanna and G. Crnrick**, *Effect of high salt concentrations on the determination of arsenic and selenium by flow injection hydride generation electro thermal atomic absorption spectrometry*, Analyst 123, pág. 1697, **1998**;
- [52] **A. D'Ulivo, Z. Mester, J. Meija, R. E. Sturgeon**. *Mechanism of Generation of Volatile Hydrides of Trace Elements by Aqueous Tetrahydroborate(III). Mass Spectrometric Studies on reaction Products and Intermediates*, Anal. Chem. 79, pág. 3008, **2007**.
- [53] **M. D. S. Pereira, E. Winter, J. R Guimarães, S. Rath, A. H. Fostier**, *A simple voltammetric procedure for speciation and evaluation of As removal from water*, Environmental Chemistry Letters 5, pág. 137, **2007**;
- [54] **W. R. Mindak, S. P. Dolan**, *Determination of Arsenic and Selenium in Food using a Microwave Digestion-Dry Ash Preparation and Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, Journal of Food Composition and Analysis 12, pág. 111, **1999**;
- [55] **T. Näykki, P. Perämäki, J. Kujala, A Mikkonen**, *Optimization of a flow injection hydride generation atomic absorption spectrometric method for the determination of arsenic, antimony and selenium in iron chloride/sulfate-based water treatment chemical*, Analytica Chimica Acta 439, pág 229, **2001**;

[56] Z. Li, X. Yang, Y. Guo, H. Li, Y. Feng, *Simultaneous determination of arsenic, antimony, bismuth and mercury in geological materials by vapor generation-four-channel non-dispersive atomic fluorescence spectrometry*, *Talanta* 74, pág 915, **2008**.



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1643e

Trace Elements in Water

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating methods used in the determination of trace elements in fresh water. SRM 1643e consists of approximately 250 mL of acidified water in a polyethylene bottle, which is sealed in an aluminized plastic bag to maintain stability. SRM 1643e simulates the elemental composition of fresh water. Nitric acid is present at a concentration of approximately 0.8 mol/L to stabilize the trace elements.

Certified Values: The certified values for 29 elements in SRM 1643e are listed in Table 1. All values are reported both as mass fractions ($\mu\text{g}/\text{kg}$) and as mass concentrations ($\mu\text{g}/\text{L}$). A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST [1]. The certified values are the average of the gravimetrically prepared value and a value determined by either inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) or inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The expanded uncertainty for each certified value is calculated as

$$U = ku_c$$

where k is the coverage factor for a 95 % confidence interval and u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO and NIST Guides [2]. The value of u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the gravimetric preparation, the ICP-MS or ICP-OES determination, method bias [3], and stability.

Information Value: A rhenium value is listed in Table 2 for information purposes only. An information value is considered to be a value that will be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value [1]. The information value is based on results from one NIST method.

Expiration of Certification: This certification of SRM 1643e is valid, within the measurement uncertainties specified, until **31 March 2014**, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate. This certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certification, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Coordination of the NIST technical measurements was under the direction of T.A. Butler and G.C. Turk of the NIST Analytical Chemistry Division. The ICP-MS analyses were performed by T.A. Butler, L.L. Yu, and G.C. Turk. The ICP-OES analyses were performed by T.A. Butler and G.C. Turk.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.D. Leigh and D.D. Leber of the NIST Statistical Engineering Division.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 26 March 2009
See Certificate Revision History on Last Page

SRM 1643e

Page 1 of 3

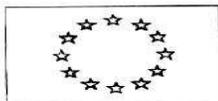
Table 1. Certified Values, Expanded Uncertainties, and Coverage Factors for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Mass Concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)			<i>k</i>
	Value	±	U	Value	±	U	
Aluminum	138.33	±	8.4	141.8	±	8.6	3.2
Antimony	56.88	±	0.60	58.30	±	0.61	2.0
Arsenic	58.98	±	0.70	60.45	±	0.72	2.0
Barium	531.0	±	5.6	544.2	±	5.8	2.0
Beryllium	13.64	±	0.16	13.98	±	0.17	2.0
Bismuth	13.75	±	0.15	14.09	±	0.15	2.0
Boron	154.0	±	3.8	157.9	±	3.9	2.4
Cadmium	6.408	±	0.071	6.568	±	0.073	2.0
Calcium	31 500	±	1 100	32 300	±	1 100	2.8
Chromium	19.90	±	0.23	20.40	±	0.24	2.0
Cobalt	26.40	±	0.32	27.06	±	0.32	2.0
Copper	22.20	±	0.31	22.76	±	0.31	2.1
Iron	95.7	±	1.4	98.1	±	1.4	2.0
Lead	19.15	±	0.20	19.63	±	0.21	2.0
Lithium	17.0	±	1.7	17.4	±	1.7	3.2
Magnesium	7 841	±	96	8 037	±	98	2.0
Manganese	38.02	±	0.44	38.97	±	0.45	2.0
Molybdenum	118.5	±	1.3	121.4	±	1.3	2.0
Nickel	60.89	±	0.67	62.41	±	0.69	2.0
Potassium	1 984	±	29	2 034	±	29	2.1
Rubidium	13.80	±	0.17	14.14	±	0.18	2.0
Selenium	11.68	±	0.13	11.97	±	0.14	2.0
Silver	1.036	±	0.073	1.062	±	0.075	3.2
Sodium	20 230	±	250	20 740	±	260	2.0
Strontium	315.2	±	3.5	323.1	±	3.6	2.0
Tellurium	1.07	±	0.11	1.09	±	0.11	3.2
Thallium	7.263	±	0.094	7.445	±	0.096	2.0
Vanadium	36.93	±	0.57	37.86	±	0.59	2.1
Zinc	76.5	±	2.1	78.5	±	2.2	2.6

Table 2. Information Value for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mass Concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Rhenium	110	113

Preparation of Material: SRM 1643e was prepared at NIST using only high purity reagents. The containers were acid cleaned before use. In the preparation, a polyethylene cylindrical tank was filled with deionized water and sufficient nitric acid to make the solution approximately 0.8 mol/L. Known masses of the matrix elements (sodium, potassium, calcium, and magnesium) were added to the tank solution as solutions prepared from the same primary materials used to prepare the SRM 3100 Series of Single Element Solutions. Known masses of the other elements were then added to the tank solution using weighed aliquots of the SRM 3100 Series. The final total mass of the tank solution was determined, allowing calculation of the gravimetrically prepared mass fraction for each element. Mass concentrations were calculated using the measured density of 1.025 g/mL. After mixing thoroughly, the solution was transferred to clean 250 mL polyethylene bottles.



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR[®] – 414

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PLANKTON			
Element	Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of results p
	Certified value ¹⁾ [mg/kg]	Uncertainty ²⁾ [mg/kg]	
As	6.82	0.28	12
Cd	0.383	0.014	9
Cr	23.8	1.2	7
Cu	29.5	1.3	17
Hg	0.276	0.018	7
Mn	299	13	9
Ni	18.8	0.8	8
Pb	3.97	0.19	10
Se	1.75	0.10	8
V	8.10	0.18	4
Zn	111.6	2.5	15

¹⁾ Unweighted mean value of the means of p accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified values are traceable to the SI.
²⁾ Half-width of the 95 % confidence intervals.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

NOTE

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

Brussels, March 1992
Latest revision: May 2007

Signed: _____


Prof. Dr. Hendrik Emons
Unit for Reference Materials
EC-JRC-IRMM
Retieseweg 111
2440 Geel, Belgium