

## ELETROFORESE CAPILAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA COM PLASMA: UMA FERRAMENTA EFICIENTE PARA A ESPECIAÇÃO

Ana Paula G. Gervasio\*, André F. Lavorante, Maria Carolina B. Moraes e Maria Fernanda Giné

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, 13400-970 Piracicaba - SP

Carlos E. S. Miranda e Emanuel Carrilho

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13566-590 São Carlos - SP

Recebido em 26/11/01; aceito em 25/7/02

CAPILLARY ELECTROPHORESIS COUPLED TO PLASMA SPECTROMETRY: AN EFFICIENT TOOL FOR SPECIATION. The most important features of the CE-ICP hyphenation, as well as its advantages and drawbacks as a tool for speciation are discussed. The fundamental principles of capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry are also presented. Some applications involving different designs proposed in the literature to couple CE and ICP system for elemental speciation are reviewed.

Keywords: speciation; CE-ICP-MS; CE-ICP-OES.

### INTRODUÇÃO

Os metais pesados, largamente utilizados pela indústria, normalmente, não se encontram como íons livres ou em sua forma original no ambiente mas, ocorrem como parte de espécies químicas que são resultantes de uma série de processos naturais bio-geo-químicos, associados ou não às interferências humanas<sup>1</sup>. Isso significa que as diversas espécies de um mesmo elemento apresentam comportamentos diferenciados, o que pode comprometer a exatidão do método durante sua determinação<sup>2</sup>. Percebe-se, portanto, que é necessário fazer, além da determinação quantitativa total dos elementos presentes nas diferentes amostras, a identificação de cada espécie.

As principais áreas de interesse da especiação envolvem o monitoramento da poluição nos solos, ar, águas, sedimentos e biota por espécies organometálicas e inorgânicas tóxicas. Muitos estudos relacionados à biometilação de metais (especialmente mercúrio) e semi-metals (arsênio e selênio) têm sido feitos, uma vez que estes elementos podem apresentar um alto nível de toxidez, dependendo do estado de oxidação em que se encontram<sup>3</sup>. Além disso, deve ser considerado que o estudo da cinética de elementos traços no corpo humano, devido à exposição aos metais, não seria possível sem as informações fornecidas pela especiação.

O controle homeostático e metabolização de elementos essenciais, como zinco e cobre, e dos tóxicos, como mercúrio e arsênio, por organismos da biota também têm sido objeto de muitos estudos devido à importância econômica e às implicações ambientais da utilização desses elementos. Uma das áreas de maior interesse, no campo da especiação, é aquela relacionada às metalotioneínas (MT), as quais são um grupo de proteínas, não-enzimáticas, de baixa massa molar, ricas em cisteínas, resistentes à termo-coagulação e à precipitação ácida e que possuem um ligante metálico em sua estrutura. A principal característica das metalotioneínas é formar complexos com os metais bivalentes e complexos metal-tiol. Decorrente dessa característica, em sistemas biológicos, a síntese da proteína só ocorre induzida por metais<sup>4</sup>. Devido à importância das MT em sistemas biológicos, a escolha e otimização de sistemas acoplados para a determinação dos diferentes complexos com os metais ainda é motivo

de vários estudos. Uma vez que as MT, para os diferentes organismos, possuem diferentes isoformas, a identificação e determinação de uma isoforma podem contribuir para uma melhor compreensão do papel e funções das isoformas<sup>5</sup>. Para facilitar a compreensão desses fenômenos é necessário empregar técnicas analíticas que combinem alta seletividade, resolução adequada, alta sensibilidade e limites de detecção em nível de ng g<sup>-1</sup> ou menos.

O monitoramento biológico de elementos em nível traço, através de biotraçadores, os quais servem para medir o grau de exposição a determinados elementos, também tem apresentado um grande desenvolvimento<sup>3</sup>.

A contaminação de alimentos como ostras e mexilhões por organo-estanho, peixes por metil-mercúrio e vinhos por compostos de chumbo tem sido objeto de muitos estudos no campo da especiação devido às suas implicações econômicas e ambientais. Existem legislações que tratam da especiação, uma vez que o comércio de alimentos apresenta restrições legais com respeito à concentração e forma química de elementos de metais pesados, os quais são bem conhecidos do ponto de vista toxicológico<sup>3</sup>.

Em certos casos, as informações sobre a especiação elementar, em níveis de ng mL<sup>-1</sup>, podem ser obtidas mais facilmente quando duas técnicas são acopladas. Nesse tipo de hibridização, seleciona-se uma técnica que apresente uma alta capacidade de separação das espécies de interesse e outra que apresente alta sensibilidade, de forma que mesmo os analitos presentes em baixas concentrações possam ser detectados. Entre as técnicas de separação destaca-se a cromatografia líquida (LC: "liquid chromatography"), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC: "high performance liquid chromatography"), a cromatografia gasosa (GC: "gas chromatography"), a cromatografia com fluido supercrítico (SFC: "supercritical fluid chromatography") e a eletroforese capilar (CE: "capillary electrophoresis"). Com respeito à detecção, a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS: "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry") é considerada uma técnica bastante adequada para as análises elementares devido ao baixo limite de detecção, à capacidade multi-elementar e à capacidade de fornecer informações sobre isótopos.

Assim, o acoplamento da HPLC, GC, SFC ou CE com o ICP-MS é uma poderosa ferramenta que reúne alta capacidade de separa-

\*e-mail: gervasio@cena.usp.br

ção e alta sensibilidade, o que é muito vantajoso no caso da especiação elementar. O emprego do ICP-MS acoplado à eletroforese capilar, para a especiação elementar, tem recebido muita atenção por parte de vários grupos de pesquisa.

Entretanto, certas considerações com respeito ao acoplamento CE-ICP-MS devem ser feitas. Para que o acoplamento CE-ICP-MS seja implementado, os parâmetros operacionais de cada técnica devem estar muito bem estabelecidos, uma vez que o êxito desse acoplamento está estreitamente relacionado à interface cujo volume morto pode afetar a resolução da separação eletroforética. Contudo, deve ser salientado que os parâmetros adequados de cada técnica considerados individualmente não são, necessariamente, compatíveis entre ambas. Como exemplo, é possível citar a vazão normalmente utilizada em cada técnica, a qual, no caso do ICP-MS, é da ordem de mL min<sup>-1</sup>, dependendo do tipo de nebulizador empregado, enquanto que em CE, é da ordem de nL min<sup>-1</sup>.

## A ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA

O plasma é um gás parcialmente ionizado, no qual as amostras são introduzidas de forma líquida e, após os processos de dessolvatação, dissociação, atomização e ionização, obtém-se a produção de íons simples dos elementos da amostra simultaneamente. O sistema de ionização por ICP é constituído de uma tocha de quartzo que consiste de três tubos concêntricos, por onde passa um gás (normalmente argônio) e, em cujo extremo, é formado o plasma. Existem muitas formas de introdução de amostras líquidas ou gasosas no plasma; a mais comum é através da nebulização da solução de uma amostra aquosa. A principal função do nebulizador é produzir um aerossol, o qual pode ser introduzido no plasma através do tubo interno da tocha. Os nebulizadores mais utilizados são do tipo pneumático, incluindo-se, nessa categoria, os concêntricos e os de fluxo cruzado, embora nebulizadores, como o ultra-sônico, apresentem certas vantagens sobre os primeiros<sup>6,7</sup>.

As características mais importantes do ICP são as altas temperaturas, os longos tempos de residência, a alta densidade eletrônica e o ambiente relativamente inerte<sup>8</sup>. A somatória dessas características permite uma total dessolvatação, uma vaporização completa do soluto e uma alta eficiência de atomização/ionização. Assim, a alta eficiência na produção de íons tornou o ICP uma fonte de ionização efetiva para análise multielementar por espectrometria de massas<sup>9</sup>. Existem referências abundantes, na literatura, sobre os princípios básicos da espectrometria de massas com fonte de plasma e os tipos de análises que podem ser feitas empregando essa técnica<sup>6,7</sup>. A primeira aplicação sobre ICP como fonte de íons para a espectrometria de massas foi relatada em 1978 e o primeiro instrumento tornou-se disponível comercialmente em 1983. Um diagrama esquemático do ICP-MS é apresentado na Figura 1. O acoplamento da fonte de plasma com o espectrômetro de massas exige uma interface que permita a

amostragem e seleção dos íons de interesse produzidos no plasma. A extração dos íons da região central do plasma é feita através de um orifício < 1 mm do cone amostrador por diferença de pressão. O gás sofre uma expansão após passar por esse orifício e uma fração selecionada passa pelo segundo orifício do cone separador. Uma série de lentes iônicas, submetidas a diferenças adequadas de potencial, conduz os íons na direção do quadrupolo, o analisador de massas. Os íons são selecionados sequencialmente pelo quadrupolo com base na razão massa/carga e, em seguida, enviados ao multiplicador de elétrons para detecção<sup>10</sup>.

Devido à natureza das soluções eletrolíticas utilizadas em CE, podem ocorrer variações nos sinais do ICP-MS devido a efeitos não-espectrais como aqueles que afetam o processo de transporte, a eficiência de produção de íons no plasma ou que alteram a extração e condução dos íons para o analisador de massas<sup>11</sup>. Além disso, a introdução de amostras no plasma com altos teores salinos, geralmente maiores que 2000 µg mL<sup>-1</sup>, via nebulização pneumática, causa a deposição de materiais que obstruem progressivamente o orifício do cone. Essa obstrução afeta consideravelmente a amostragem dos íons, mesmo empregando cones de amostragem com orifícios maiores que 1 mm<sup>10</sup>.

Em equipamentos com analisador de massas quadrupolar, as sobreposições dos sinais espectrais ocorrem quando as razões  $m/z$  dos íons diferem em menos de 1 u.m.a. As alterações causadas por sobreposições espectrais são as interferências mais abrangentes e difíceis de se contornar em ICP-MS<sup>11</sup>.

As interferências espectrais podem ser divididas em duas categorias, dependendo de sua origem. Na primeira categoria, incluem-se as interferências causadas por sobreposições de sinais de isótopos de diferentes elementos com a mesma  $m/z$  nominal (isobáricas) e, na outra, incluem-se as interferências causadas por íons com carga dupla ou íons contendo mais de um átomo. Um exemplo de interferência isobárica é a sobreposição espectral dos nuclídeos de <sup>112</sup>Cd (24,1%), <sup>114</sup>Cd (28,7%), <sup>116</sup>Cd (7,5%) com <sup>112</sup>Sn (1,0%), <sup>114</sup>Sn (0,7%), <sup>116</sup>Sn (14,5%), respectivamente. No caso da  $m/z$  112, se os dois elementos estiverem presentes na amostra nas mesmas concentrações, 4,1% do sinal será devido ao <sup>112</sup>Sn, e o restante (95,9%), ao <sup>112</sup>Cd. Os íons interferentes contendo mais de um átomo podem ser classificados como íons óxidos ou poliatômicos, sendo que o primeiro termo, geralmente, é dado aos íons que contêm um ou mais átomos de oxigênio ligados a um elemento refratário. O termo íon poliatômico é mais genérico e refere-se ao íon que contém dois ou mais átomos provenientes do plasma (Ar), da atmosfera circundante (O, N, C), do solvente (O, H, C, N, Cl, S) ou da amostra<sup>10</sup> (Na, Cl, Ca, etc.). O espectro de massas correspondente à análise de água ultrapura apresenta alguns destes íons interferentes<sup>9</sup>.

Acredita-se que os íons poliatômicos com maior força de ligação, tais como N<sub>2</sub><sup>+</sup> e O<sub>2</sub><sup>+</sup>, são formados no plasma, enquanto os derivados de Ar, como o ArO<sup>+</sup> e o ArN<sup>+</sup>, são, preponderantemente, formados por reações de condensação com Ar na região de expansão. Por serem formados por combinações de elementos com massa ≤ 40, os íons poliatômicos, geralmente, são encontrados no espectro de massas abaixo de 84 u.m.a.

A extensão da formação dos íons óxidos e poliatômicos e, conseqüentemente, o seu efeito interferente, depende da natureza do ácido contido na solução a ser analisada, da pureza do gás (argônio), da composição da amostra, da geometria da câmara de extração, dos parâmetros de operação do plasma e do sistema de nebulização<sup>12</sup>.

O ICP apresenta energia suficiente para atomizar e ionizar de forma eficiente as amostras, entretanto, esse método permite apenas a determinação elementar e isotópica sem considerar a forma original da espécie. No caso da especiação, isso é inconveniente, uma vez que cada espécie traz consigo a informação que define a bio-dispo-

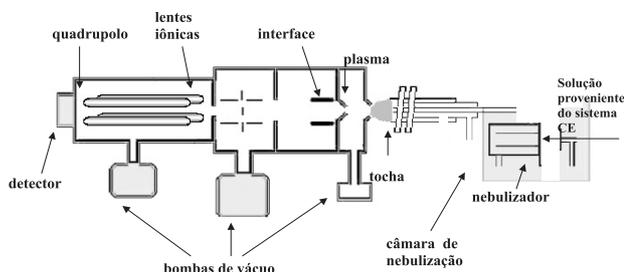
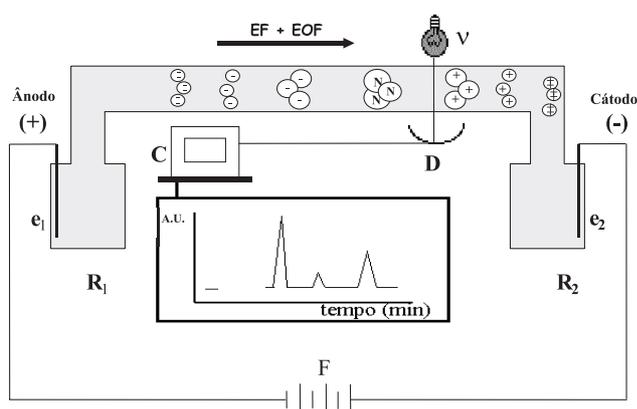


Figura 1. Diagrama esquemático do ICP-MS

nibilidade do elemento e, portanto, sua toxidez e/ou essencialidade, além de permitir a compreensão dos mecanismos biológicos<sup>3,13</sup>. Sendo assim, percebe-se a importância da especificação, a qual permite identificar e quantificar a forma química de um dado elemento seja este metal ou não metal. Essa forma química pode referir-se ao estado de oxidação de uma espécie inorgânica, ou ainda, ao tipo e número de substituintes de compostos organometálicos.

### A ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A eletroforese foi descrita, pioneiramente, por Tiselius na década de 30<sup>14</sup>, e definida como migração de espécies eletricamente carregadas em um condutor líquido, usualmente aquoso, sob a ação de um campo elétrico. O autor denominou-a de “eletroforese de fronteira móvel” e esta técnica encontra-se, ainda hoje, sendo largamente utilizada para a separação de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas. Mais recentemente, a aplicação de um campo elétrico a um tubo capilar contendo um líquido condutor tem ampliado as suas aplicações analíticas. Um diagrama esquemático do sistema CE é apresentado na Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama esquemático do sistema CE.  $R_1$  e  $R_2$  são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos ( $e_1$  e  $e_2$ ) conectados à fonte de potência (F). Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação ( $v$ ) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais

### Eletroforese Capilar em Solução Livre

Entre as modalidades de eletroforese capilar, encontra-se a eletroforese capilar de zona (CZE: “Capillary Zone Electrophoresis”), a qual é também denominada eletroforese capilar em solução livre<sup>15</sup> (FSCE: “Free Solution Capillary Electrophoresis”). O termo CE pode ser empregado genericamente para CZE, MEKC (MEKC: “Micellar Electrokinetic Chromatography”) e CGE (“Capillary Gel Electrophoresis”)<sup>16</sup> e foi adotado neste trabalho. A FSCE é empregada na análise de solutos iônicos que diferem em suas razões carga/raio. Esta é a modalidade de eletroforese mais utilizada porque é bastante adequada para a separação de solutos iônicos, os quais incluem ânions e cátions inorgânicos<sup>17-19</sup>, ácidos<sup>20,21</sup> e aminas orgânicos e ainda macromoléculas como proteínas<sup>22</sup>. Além de ser uma técnica versátil, CE requer uma instrumentação relativamente simples. Como já visto, as moléculas que apresentam a mesma carga, mas raios iônicos diferentes podem ser separados por CE<sup>23</sup>. Entretanto, moléculas neutras não podem ser separadas, uma vez que não possuem carga, e por isso são eluídas sem separação. Na CE, o capilar é

preenchido com uma solução tampão de composição constante, a qual está presente tanto no ânodo como no cátodo. Em uma amostra tem-se uma mistura de espécies carregadas eletricamente e espécies neutras, as primeiras, ou seja, os íons, apresentam tamanhos e cargas diferentes. De modo geral, a amostra é introduzida na extremidade anódica do tubo e, ao ser aplicada uma diferença de potencial entre as extremidades da coluna, os íons migram através do tubo com diferentes velocidades e em diferentes sentidos. A velocidade e o sentido de migração dependem do tamanho e da magnitude de carga de cada íon. Deve ser ressaltado que as espécies neutras não sofrem influência do campo elétrico e por isso migram conjuntamente.

Na CE, além dos solutos, a solução tampão, normalmente, move-se através do capilar sob o efeito de um campo elétrico. Este fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico (EOF: “Electroosmotic Flow”) ou eletro-endosmótico. Durante uma operação convencional, o EOF origina-se no ânodo e dirige-se ao cátodo devido à formação de uma dupla camada iônica que ocorre na interface entre o capilar de sílica fundida e a solução nele contida. Os grupos silanóis presentes na superfície do capilar são ácidos fracos que se ionizam a partir de pH 3-4 (estando totalmente ionizados em meio alcalino), criando uma superfície carregada negativamente. Esta camada negativa na superfície atrai para sua proximidade as espécies carregadas positivamente da solução, formando uma camada positiva, a qual será mobilizada pela presença do campo elétrico. A atração dessa camada pelo cátodo arrasta a solução do interior da coluna, criando assim um fluxo com perfil reto, em contraste com o perfil parabólico que é criado em sistemas pressurizados como a HPLC.

O EOF proporciona duas grandes vantagens. A primeira delas é que cátions e ânions podem ser separados numa única análise. De outro modo, na ausência do fluxo eletrosmótico, seriam necessárias duas análises, uma com a polaridade negativa para a análise de cátions e a outra com a polaridade positiva para a análise de ânions, e as espécies neutras não se moveriam através do capilar. A outra vantagem é que mesmo os íons com razões carga/raio muito diferentes podem ser analisados em um tempo relativamente curto devido à magnitude do EOF<sup>15</sup>.

O pH da solução tampão é um dos parâmetros que afeta fortemente a separação em CE. Este parâmetro afeta tanto o EOF quanto a mobilidade eletroforética dos analitos. À medida que o pH é elevado tem-se um aumento do EOF, pois ocorre um aumento da dissociação dos grupos Si-OH que se encontram nas paredes internas do capilar. O fluxo eletrosmótico é também afetado pela concentração do tampão e pela força iônica mas, sobretudo, pelo pH. No que se refere ao controle da seletividade da separação dos analitos, a variação do pH afeta o grau de ionização dos analitos e, portanto, suas mobilidades eletroforéticas. Normalmente, o tampão é escolhido para promover a melhor separação entre os analitos e não necessariamente a velocidade eletrosmótica mais adequada<sup>15</sup>.

### O ACOPLAMENTO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA COM A ELETROFORESE CAPILAR

Os mecanismos de separação e a alta resolução tornaram a eletroforese capilar uma técnica muito eficiente para a separação de espécies químicas iônicas com razões carga/massa semelhantes. As potencialidades dessa técnica têm sido exploradas na especificação de As e Se, assim como na especificação de metaloproteínas<sup>24,25</sup>. Entretanto, as aplicações da eletroforese capilar têm sido limitadas pela baixa sensibilidade dos detectores UV e de fluorescência, os quais são, normalmente, empregados em CE. Sendo assim, a expansão da CE depende da investigação de detectores de alta sensibilidade e seletividade<sup>26</sup>. Considerando-se o pequeno volume de amostra que é

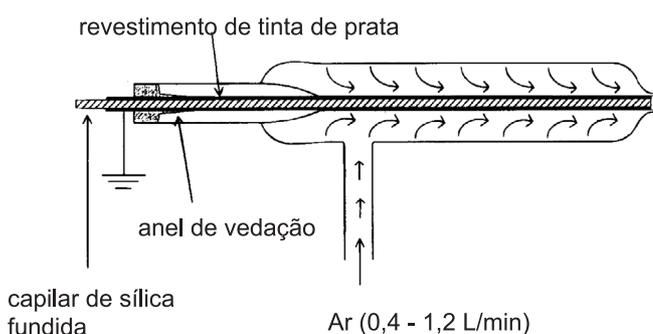
utilizado em CE (até 100 nL), percebe-se a necessidade do emprego de detectores com alta sensibilidade para a análise daquelas espécies que ocorrem em concentrações muito baixas na natureza e que sejam compatíveis com a CE.

A interface não deve provocar o alargamento da banda eletroforética e, ao mesmo tempo, deve transportar o aerossol da amostra até o plasma de forma eficiente, favorecendo os processos de vaporização, atomização, ionização e excitação<sup>26</sup>. Um recurso utilizado para implementar a interface CE-ICP-MS é a introdução do capilar no interior do nebulizador. Vários tipos de interface, feitas nos próprios laboratórios de pesquisa, empregando nebulizadores concêntricos<sup>26-30</sup> e micro-concêntrico<sup>31-34</sup>, de injeção direta<sup>35</sup> (DIN: Direct Injection Nebulizer), de alta eficiência<sup>27</sup> (HEN: High Efficient Nebulizer) e ultra sônico<sup>36</sup>, têm sido propostos. Dentre esses, o HEN é o mais adequado para as micro-amostragens necessárias para os acoplamentos com HPLC, CE e FIA (FIA: Flow Injection Analysis) ou mesmo para conseguir maior frequência analítica. A sua construção e operação são simples. O aumento de eficiência é conseguido pelo aumento na energia cinética do gás de nebulização e pela otimização da razão líquido/gás no aerossol.

No período compreendido entre 1991 e 1994, Olesik e colaboradores<sup>37, 38</sup> publicaram dois importantes trabalhos sobre a influência do volume de solução introduzido no plasma na formação do aerossol, no transporte e nos mecanismos de atomização em espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado por indução (ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) e por ICP-MS, empregando vazões de solução de amostra da ordem de  $\mu\text{L min}^{-1}$ . De acordo com os resultados obtidos, os autores constataram que a formação do aerossol e seu transporte até o plasma também eram eficientes mesmo empregando pequenos volumes de amostra.

Considerando as características obtidas com pequenos volumes de amostras, em 1995, Olesik *et al.*<sup>26</sup> publicaram um trabalho sobre o primeiro acoplamento CE-ICP-MS, empregando uma interface que possibilitava a introdução de um pequeno volume de solução no espectrômetro.

O acoplamento pioneiro CE-ICP proposto por Olesik *et al.*<sup>26</sup> foi obtido introduzindo-se uma coluna capilar no interior de um nebulizador concêntrico, de modo que se obteve um volume morto mínimo. Um comprimento de 4-5 cm da parte externa do capilar foi revestido com uma tinta de prata, para permitir o contato elétrico entre a solução e a extremidade aterrada do capilar, como é mostrado na Figura 3. A aspiração da solução para o interior do capilar foi um dos principais problemas encontrados pelos pesquisadores. Durante a execução do trabalho, o fluxo eletrosmótico calculado foi de  $0,051 \pm 0,014 \mu\text{L min}^{-1}$ . Por causa da natureza do nebulizador concêntrico, obteve-se uma taxa de aspiração de  $2,0 \mu\text{L min}^{-1}$  (aspiração) enquan-



**Figura 3.** Diagrama esquemático da primeira interface desenvolvida para CE-ICP empregando nebulizador pneumático com a parte interna revestida com tinta de prata. Ref. 26, com permissão

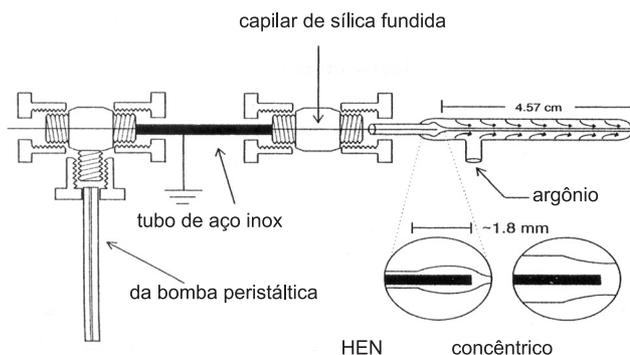
to a vazão do gás de nebulização foi de  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ . Essa aspiração é problemática em CE-ICP-MS, pois o analito migra mais rápido do que sob as condições convencionais em CE. Isso implica em uma diminuição na resolução dos picos ou até em sua total sobreposição.

Uma interface CE-ICP foi proposta por Liu *et al.*<sup>35</sup>, a partir da modificação de um nebulizador de injeção direta. O capilar foi introduzido concêntricamente no interior do DIN e ambos foram fixados em um conector cruzado "PEEK", especialmente construído para o estudo. Uma solução eletrolítica foi introduzida no interior do conector para possibilitar um contato elétrico estável e constante entre o eletrodo de platina e a extremidade aterrada do capilar. O emprego da solução eletrolítica com vazão de  $15 \mu\text{L min}^{-1}$  permitiu que o sistema DIN fosse otimizado, tornando possível uma introdução eficiente da amostra no ICP-MS. O DIN, quando comparado ao nebulizador convencional, apresenta importantes vantagens, tais como eficiência de 100% na introdução da amostra, minimização do efeito de memória, pequeno volume interno ( $< 2 \mu\text{L}$ ) e introdução de amostras utilizando baixas velocidades de fluxo. Devido à baixa velocidade de fluxo e eficiência na nebulização, é possível trabalhar com gradientes de concentração sem alterar as condições operacionais do ICP. Isto resulta em melhor precisão e limite de detecção<sup>8</sup>.

A modificação de um nebulizador ultra-sônico foi proposta por Lu e Barnes<sup>36</sup> para implementar o acoplamento com o ICP-MS. A câmara de nebulização foi modificada para acomodar, em seu orifício de entrada da amostra, dois capilares concêntricos, um eletroforético e um externo. Uma solução eletrolítica que fluía entre os capilares externo e eletroforético permitiu que o circuito elétrico fosse fechado.

A interface proposta por Mei *et al.*<sup>32</sup> consistia de um corpo de quartzo com três braços. Dois braços foram utilizados como os capilares principal e secundário, respectivamente, enquanto que um dos braços foi conectado diretamente ao nebulizador micro-concêntrico. O circuito foi fechado mergulhando-se o eletrodo negativo no reservatório da solução tampão e o eletrodo positivo no reservatório da solução eletrolítica. A diferença de potencial negativa aplicada permitiu que fosse estabelecido um fluxo eletrosmótico contrário ao fluxo de aspiração do nebulizador.

Várias estratégias têm sido estudadas para controlar o efeito da aspiração na separação eletroforética. A maioria dessas estratégias envolve a adição de uma solução auxiliar que equilibre a ação pneumática do nebulizador<sup>3</sup>. Todos esses procedimentos exigem ajustes precisos para reduzir o efeito da aspiração e manter as condições eficientes de transporte da amostra para o plasma. Kinzer *et al.*<sup>27</sup> introduziram, pioneiramente, o fluxo auxiliar de eletrólito ("make up") através de uma peça em forma de T. Nesse estudo, foram empregados o nebulizador HEN e o concêntrico (Figura 4). Os autores



**Figura 4.** Diagrama esquemático da primeira interface CE-ICP com introdução do fluxo do eletrólito auxiliar empregando nebulizador pneumático. Ref. 27, com permissão

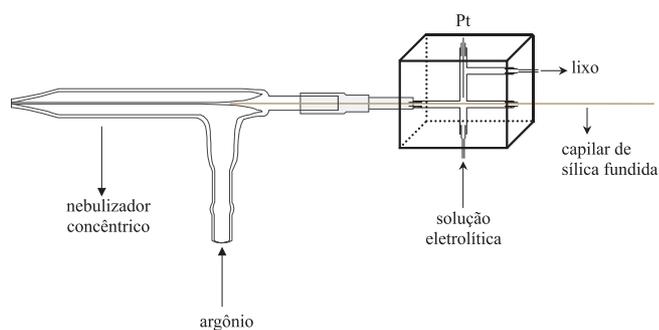
demonstraram que o fluxo laminar formado no capilar poderia ser controlado pela vazão do fluxo auxiliar. Essa proposta foi eficiente para os dois tipos de nebulizadores avaliados.

Posteriormente, Stewart e Olesik<sup>39</sup> desenvolveram uma nova interface CE-ICP-MS empregando um nebulizador HEN. A modificação feita, em relação à primeira interface<sup>26</sup>, reside no posicionamento do eletrodo. Este foi construído com um tubo de aço inox de 5 cm de comprimento x 1,52 mm de d.e. e 1,0 mm de d.i.. O tubo de aço foi fixado entre duas peças em *T*, semelhantes àquela proposta por Kinzer *et al.*<sup>27</sup>. O capilar de sílica fundida (60 cm x 75  $\mu$ m d.i.) foi introduzido no nebulizador passando pelas duas peças *T* e pelo tubo de inox.

Empregando um nebulizador concêntrico modificado, Chan e Chan<sup>40</sup> propuseram uma interface onde a parte central do nebulizador foi substituída por uma coluna de sílica fundida de 100  $\mu$ m de d.i. e, aproximadamente, 363  $\mu$ m de d.e. Um fio de platina de 25  $\mu$ m foi utilizado como eletrodo e inserido entre o nebulizador e a coluna capilar.

No sistema proposto por Tangen *et al.*<sup>41</sup> foi empregado um nebulizador micro-concêntrico, onde o capilar de sílica fundida foi adaptado paralelamente à linha de introdução do nebulizador. O contato elétrico foi mantido utilizando uma peça em formato de cruz, na qual foram adaptados o eletrodo, o capilar de sílica fundida e o conector que permitia a entrada da solução eletrolítica.

No caso das interfaces propostas por estes pesquisadores<sup>39-41</sup>, a ocorrência de bolhas durante a separação eletroforética seria bastante inconveniente. À medida que são geradas, as bolhas aderem à superfície do eletrodo e causam a interrupção da corrente elétrica. A flutuação da intensidade de corrente causa alterações no tempo de migração e, portanto, na separação dos analitos. A consequência imediata, é a perda de repetibilidade dos sinais. Nesse caso, para evitar o acúmulo de bolhas na superfície do eletrodo e facilitar a remoção das mesmas entre as análises, foi proposta a interface mostrada na Figura 5. A interface foi construída em acrílico e, na mesma, foram inseridos o capilar eletroforético, o eletrodo de Pt, um conector que permitia a entrada do eletrólito e um conector que servia como uma saída alternativa para remoção das bolhas formadas na superfície do eletrodo<sup>42</sup>.



**Figura 5.** Representação esquemática da interface para eliminar bolhas geradas durante as corridas eletroforéticas. **a-** vista frontal do dispositivo em acrílico; **b-** interface empregando nebulizador pneumático

Muitas informações disponíveis na área de Química Ambiental foram obtidas a partir de desenvolvimento de metodologias em Química Analítica para a determinação de elementos em níveis de ng mL<sup>-1</sup>.

Considerando-se as determinações empregando o sistema CE-ICP-MS, as principais interferências no ICP-MS podem ser minimizadas alterando-se a concentração de sais dissolvidos e, principalmente, a concentração de matéria orgânica no tampão. Como

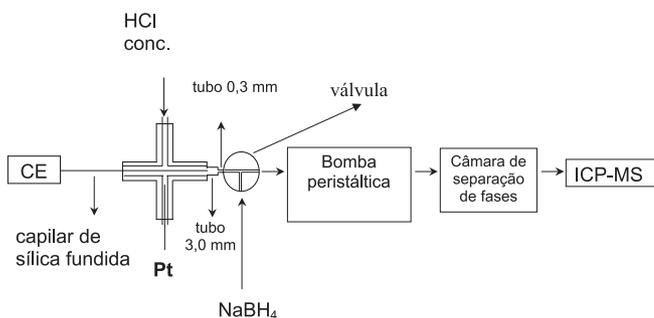
resultado, dependendo do isótopo de interesse, o limite de detecção seria em nível de fg.

Uma das limitações da interface CE-ICP-MS é a pequena eficiência de nebulização da amostra devido ao baixo fluxo da CE, nL min<sup>-1</sup>, comparado à injeção usando um nebulizador concêntrico, que é de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para aumentar a eficiência de nebulização, vários autores vêm propondo o uso dos nebulizadores micro-concêntricos e do HEN que trabalham com fluxos menores,  $\mu$ L min<sup>-1</sup>, mas que ainda são altos comparados com as vazões da CE<sup>43-46</sup>. Uma segunda limitação do acoplamento CE-ICP-MS é a alta concentração de sais na solução devido ao eletrólito ou tampão de análise<sup>47</sup>. De acordo com os processos que ocorrem no plasma, as gotículas formadas na nebulização perdem o solvente e pode ocorrer a formação de um “precipitado” no nebulizador devido à grande quantidade de sal dissolvido no tampão, o que resulta em um alto efeito de memória, baixa eficiência de ionização e entupimento do nebulizador. Além disso, uma parte destes sais é nebulizada e ionizada e pode provocar contaminação do cone de amostragem, das lentes do “skimmer” e interferência isobárica.

Uma das formas de se evitar estes dois problemas é a transferência das espécies de interesse na forma gasosa para o ICP-MS. A técnica mais utilizada em ICP para gerar espécies gasosas da solução aquosa é a geração de hidretos (HG: “Hydride Generation”). A grande vantagem é que não há necessidade de se utilizar nebulizadores e a fase gasosa é separada da fase líquida, impedindo a injeção dos sólidos dissolvidos no tampão para dentro do plasma. Um nebulizador pneumático comercial apresenta uma eficiência entre 1 e 5% de transporte da amostra, enquanto a introdução de vapores garante 100% de introdução do hidreto gerado na tocha<sup>10</sup>. O selênio tem uma baixa produção de íons no plasma, somente 33%. Portanto, é importante conseguir uma alta eficiência de transferência do elemento para o plasma. A técnica de CE apresenta algumas vantagens sobre as técnicas de HPLC e IC (IC: “Ionic Chromatography”) o baixo custo da montagem do sistema de separação, a maior versatilidade na escolha do eletrólito, a maior resolução dos picos devido ao fluxo laminar e a falta de interação com a fase estacionária.

A hifenação CE-HG apresenta duas grandes limitações: a necessidade de se obter uma boa resolução entre as espécies com uma diferença no tempo de migração superior a 20 s, para haver tempo do hidreto ser gerado e levado ao detector sem perda de resolução e, devido ao excesso de hidrogênio gerado a reação é muito turbulenta, podendo ocorrer contra-pressão no capilar.

Magnuson *et al.*<sup>47</sup> propuseram o primeiro acoplamento CE-HG-ICP-MS em 1997, para a especificação de arsênio. Em um segundo trabalho<sup>48</sup>, o mesmo sistema foi empregado para especificação de As(III), As(V), MMA, DMA, Se(IV) e Se(IV). Magnuson *et al.*<sup>47</sup> sugeriram como sistema de separação de fases (líquido-gasosa) um tubo de teflon poroso com 60 cm de comprimento e d.i. de 0,8 mm da International Polymer Engineering (Tempe, AZ, USA). No sistema, o capilar da CE fecha o contato em uma peça em cruz e uma solução de HCl concentrado é usado como solução eletrolítica auxiliar e também com pré-redutor das espécies de interesse. A Figura 6 mostra o sistema proposto por Magnuson *et al.*<sup>47</sup>. A bomba peristáltica, colocada após a CE, tem como objetivo evitar que o hidrogênio gerado em excesso durante a HG provoque uma pressão contrária à do fluxo no capilar e, além disto, tem a função de aspirar a solução de HCl. Esta sucção acaba provocando uma alteração no fluxo do capilar. Para evitar este problema, os autores utilizam um tubo com diâmetro menor (0,3 mm). A principal limitação no método proposto foi a falta de eficiência na redução do Se(VI) para Se(IV). O tempo utilizado de contato/conversão do HCl com a amostra foi de 24 s, o que permitiu uma redução de somente 30% do selênio. Tempos maiores causam deformação e perda de resolução dos picos.



**Figura 6.** Representação esquemática da primeira interface CE-HG-ICP-MS. Pt- eletrodo de platina. Ref. 47, com permissão

Um terceiro trabalho encontrado na literatura foi publicado em 1999 por Tian *et al.*<sup>49</sup>. A pesquisa baseou-se na avaliação de um sistema de suporte móvel para a realização da geração de hidreto acoplada à CE. Este suporte móvel é um carrusel de fita de vídeo recoberto com filtro de papel, de 6 mm de espessura, que é impregnado com uma solução de ácido orgânico. Neste caso, foi utilizado ácido tartárico, e  $\text{KBH}_4$  em pó, para a redução das espécies de interesse. Um ponto que vale a pena ser relatado é o problema com o baixo fluxo da CE,  $\text{nL min}^{-1}$ , e a falta de homogeneidade dos reagentes impregnados no filtro. Como o fluxo da CE é muito pequeno, a área onde ocorre a reação é limitada e pode não haver quantidade suficiente de uns dos reagentes impregnados no filtro nesta área. Para contornar este problema os autores propuseram o uso do  $\text{KBH}_4$  como solução eletrolítica auxiliar. A fita foi impregnada somente com o ácido tartárico. A interface com o sistema CE foi feita com uma peça em T onde confluiam o capilar, o eletrodo aterrado e a solução eletrolítica ( $\text{KBH}_4$ ). O capilar da eletroforese foi posicionado poucos centímetros acima da cama móvel. A câmara tem o volume de 10 mL e uma entrada para o fluxo de argônio para o arraste dos hidretos gerados para dentro do ICP-MS. A vantagem desta montagem é que não há geração de líquido, que necessitaria ser aspirado da câmara.

## INTERFACE CE-ICP: APLICAÇÕES EM QUÍMICA ANALÍTICA

Olesik *et al.*<sup>26</sup> quando propuseram o primeiro acoplamento CE-ICP-OES e CE-ICP-MS em 1995, avaliaram a separação das espécies de Cr(VI) e Cr(III) em soluções de referência. Para uma injeção hidrodinâmica por gravidade de 15 s (0,14  $\mu\text{L}$ ) o limite de detecção obtido, para o cromo, foi de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , monitorando-se a  $m/z$  52, que é a massa mais abundante de cromo. Recentemente, Stewart e Olesik<sup>39</sup> avaliaram os processos de hidrólise que ocorrem em soluções aquosas contendo cromo. Assim, foi possível empregar o acoplamento CE-ICP-MS para separar e detectar as espécies monoméricas e poliméricas de Cr(III) em soluções aquosas.

Ainda considerando a especiação de cromo, Mei *et al.*<sup>32</sup> determinaram Cr(III) e Cr(VI) em soluções de referência com concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  empregando uma coluna de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. e um volume de, aproximadamente, 2,4  $\mu\text{L}$  de amostra. Foram obtidos resultados melhores quando se empregou um nebulizador do tipo micro-concêntrico. Nesse caso, foi empregada uma solução contendo 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Cr(III) e Cr(VI). Contudo, foi requerido um intervalo de tempo para a análise de cromo de 12 min. A principal dificuldade de utilização do sistema químico proposto por Mei *et al.*<sup>32</sup> é o emprego de solução ácida como solução eletrolítica auxiliar (0,05  $\text{mol L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ ).

Chan e Chan<sup>40</sup> também propuseram uma interface CE-ICP-MS para a especiação e determinação de Cr(III) e Cr(VI) em soluções de

referência. Com esse sistema, foi obtido um limite de detecção de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cromo.

Um outro sistema CE-ICP-MS foi proposto por Tangen *et al.*<sup>41</sup> para a análise de Cr(III) e Cd(II). Um aspecto importante desse sistema foi a introdução da amostra sem a câmara de nebulização e a distância entre a ponta do nebulizador e o plasma era de aproximadamente 5 mm. Os autores empregaram a injeção eletrocínica para a introdução da amostra no capilar eletroforético. Assim, durante a etapa de injeção eletrocínica, os cátions foram introduzidos na coluna e, posteriormente, quantificados. O limite de detecção para o Cr(III) e Cd(II) foi de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Para ambas as espécies, a precisão foi de 0,6%.

Stewart e Olesik<sup>39</sup> enfatizaram que podem ser encontradas várias espécies de Cr(III) em solução. A polimerização de cromo é dependente do pH da solução, da concentração do íon, da matriz da solução e do período de armazenamento. Considerando-se a química de soluções da espécie Cr(VI), esse também pode ser encontrado em diversas formas, dependendo da concentração e da acidez. Sena *et al.*<sup>50</sup> publicaram, recentemente, uma interessante discussão sobre esse tema. Até a década de 80, era relatado na literatura que apenas as espécies  $\text{CrO}_4^{2-}$  e  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  estariam presentes em soluções aquosas. Atualmente, já se discute a presença da espécie  $\text{HCrO}_4^-$ . Os pesquisadores têm empregado a quimiometria nos estudos de equilíbrio das espécies de Cr(VI), analisando os espectros de UV/Vis. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que a espécie protonada  $\text{HCrO}_4^-$  está, de fato, presente em soluções aquosas.

A especiação é uma ferramenta importante para a compreensão e caracterização de sistemas biológicos e ambientais. Nesse contexto, Gervasio *et al.*<sup>42</sup> propuseram uma interface para o acoplamento do sistema de eletroforese capilar ao nebulizador concêntrico do ICP-MS. Esse sistema foi avaliado para a determinação quantitativa de Cr(VI) e Cr(III) mediante a separação eletroforética das espécies Cr(VI) e Cr(III)-DTPA<sup>2-</sup>. A formação do ânion Cr(III)-DTPA<sup>2-</sup> foi garantida pelo tratamento prévio das soluções com DTPA (DTPA: “diethylenetriaminepentaacetic acid”) e aquecimento a 90 °C por 5 min. Foram feitos testes utilizando as injeções hidrodinâmica e eletrocínica das soluções. No ICP-MS, a aquisição dos dados foi feita nas  $m/z$  52 e 53. Embora a  $m/z$  52 corresponda ao isótopo mais abundante de Cr, nessa massa a sensibilidade foi prejudicada devido a um considerável sinal de fundo referente ao íon  $\text{ArC}^+$ . Com o sistema proposto, foi obtida uma curva analítica entre 0,10 e 0,50  $\text{mg L}^{-1}$  de Cr(VI) e Cr(III), monitorando-se os sinais transientes na  $m/z$  53. De acordo com os resultados, sem o aquecimento prévio, o Cr(III) não era complexado com o DTPA. Para soluções contendo entre 0,10 e 0,50  $\text{mg L}^{-1}$  de Cr(III) e Cr(VI), foram obtidos coeficientes de correlação de 0,9934 e 0,9998, respectivamente. Os limites de detecção ( $3\sigma$ ) foram de 9,3 e 4,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cr(III) e Cr(VI), respectivamente. Para soluções contendo como interferentes 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de Fe(III) e 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  de Cu(II) e de Ni(II), os coeficientes de correlação foram 0,9871 para Cr(VI) e 0,9924 para Cr(III) e os limites de detecção ( $3\sigma$ ), para Cr(III) e Cr(VI), foram de 11,17 e 4,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Os fatores de recuperação calculados para uma amostra de água de rio foram de 30 e 32%, após a adição de 0,50  $\text{mg L}^{-1}$  Cr(VI) e Cr(III)-DTPA<sup>2-</sup>. O sistema proposto permitiu avaliar e quantificar as espécies inorgânicas de Cr(VI) e Cr(III) em amostras de água de rio.

No caso de amostras de águas naturais, as substâncias húmicas representam a maior parte da matéria orgânica dissolvida. Dependendo do tipo de água<sup>51</sup>, a concentração da substância húmica pode variar entre 0,1 e 115  $\text{mg L}^{-1}$ . As propriedades físico-químicas dos metais pesados são alteradas pela interação com a matéria orgânica dissolvida e são, freqüentemente, influenciadas pelas propriedades da substância orgânica. Por essa razão, uma investigação detalhada dessas interações é um pré-requisito essencial para o conhecimento

acerca do nível de toxicidade, acúmulo e biodisponibilidade dos metais pesados no sistema a ser analisado. A complexação de íons metálicos também afeta o mecanismo de transporte geoquímico de metais no ambiente e a eficiência da remoção de metais pesados nas plantas de tratamento de água.

A introdução da solução no nebulizador empregando um dispositivo em *T* também foi empregada na separação de 12 lantanídeos. A eficiência da interface foi avaliada empregando-se um nebulizador concêntrico e o HEN acoplado a uma câmara ciclônica<sup>52</sup>. Nesse caso, os sinais obtidos com o nebulizador concêntrico foram mais largos que aqueles obtidos com o HEN. Além disso, nas condições empregadas, o sinal de fundo foi mais intenso quando se utilizou o nebulizador concêntrico. Neste, o tamanho das gotículas é maior, de forma que há um menor transporte de massa do analito para o plasma e, conseqüentemente, menor sensibilidade. A escolha do nebulizador é, portanto, crítica para se obter melhor sensibilidade na análise.

Outro fator importante a ser considerado é o volume morto da interface, o qual deve ser tão pequeno quanto possível para evitar o alargamento do pico. Majidi e Miller-Ihli<sup>28</sup> utilizaram uma interface com um nebulizador concêntrico, cuja vazão de gás era mínima para evitar a perda de resolução. Contudo, ao utilizar uma vazão do gás de nebulização menor que a ótima, a sensibilidade poderia ser afetada. Os nebulizadores concêntrico e de fluxo cruzado são construídos para operar com vazões de aproximadamente 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Já os nebulizadores de baixo fluxo de gás, DIN e HEN, são construídos para operar com vazões de 0,1 mL min<sup>-1</sup> ou menos. Esses últimos são os mais atrativos para as aplicações em CE-ICP-MS.

A determinação seletiva de espécies organometálicas produzidas por organismos vivos quando expostos à contaminação por metais tem sido amplamente estudada. Deve ser salientado que a atividade biológica dos elementos, assim como a sua toxicidade depende do estado de oxidação ou de sua forma química<sup>1</sup>. Nesse sentido, os sistemas CE-ICP-MS têm sido desenvolvidos visando permitir a especificação e determinação de elementos considerados essenciais/tóxicos.

Majidi e Miller-Ihli<sup>30</sup> propuseram, em 1998, um sistema CE-ICP-MS para a especificação de metalotioneínas (MT) em soluções de referência. Para isso, foi empregado um nebulizador concêntrico modificado. Os autores modificaram a entrada do gás do nebulizador empregando uma peça em *T*, a qual foi adaptada antes do nebulizador. Uma outra peça, também em *T*, era utilizada para fazer a introdução da solução e a adaptação do eletrodo que fechava o circuito elétrico. Nesse acoplamento, os autores empregaram uma câmara de nebulização ciclônica e, devido à geometria da interface, também fizeram um acoplamento com um nebulizador de fluxo cruzado. Obteve-se um limite de detecção de 2,36 µg mL<sup>-1</sup> para Cd em metalotioneínas.

Recentemente, Mounicou *et al.*<sup>53</sup> compararam os sistemas CE-ICP-MS e CE-ES-MS (ES-MS: "Electrospray Mass Spectrometry") para a caracterização de metalotioneínas em soluções de referência. Os autores empregaram um nebulizador micro-concêntrico como interface que foi acoplado a uma câmara de nebulização tipo "Scott". Para isso, também empregaram uma peça em *T* para a introdução da solução eletrolítica. Apesar de não terem sido apresentadas características analíticas tais como precisão, reprodutibilidade e limite de detecção, é mostrado um estudo de caracterização de complexos metálicos como metalotioneínas. A partir desse estudo, os autores concluíram que a melhor sensibilidade foi obtida quando se empregou a ES-MS, devido à menor diluição proporcionada pela vazão de 2 µL min<sup>-1</sup> da solução eletrolítica. Para o acoplamento com o ICP, a vazão empregada foi de 20 µL min<sup>-1</sup>.

Posteriormente, Chassaigne *et al.*<sup>54</sup> também avaliaram uma interface empregando um nebulizador micro-concêntrico para a caracterização de metalotioneínas em solução de referência. Nesse caso,

as características analíticas do sistema proposto também não foram apresentadas. Além disso, também não foram apresentadas as condições experimentais do ICP.

Ainda considerando a especificação de MT, o acoplamento CE-ICP-MS tem sido utilizado para estudar contaminações por metais pesados/tóxicos em sistemas biológicos e ambientais devido ao acúmulo de metais pesados decorrente também de chuva ácida. Muitos trabalhos são desenvolvidos com cianobactérias para avaliar a influência dos metais na interação com o ambiente, onde são utilizadas como biossensores naturais para avaliar sistemas aquáticos contaminados por metais pesados/tóxicos. Neste caso, as cianobactérias são importantes em sistemas aquáticos, pois acumulam metais tais como Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> em proteínas ricas em cisteína, como as metalotioneínas. Para a especificação dos metais presentes nas metalotioneínas em cianobactérias, o acoplamento CE-ICP-MS oferece condições para a separação e quantificação dos metais complexados pela metalotioneína. Esse trabalho foi realizado por Lavorante *et al.*<sup>55</sup> utilizando nebulizadores concêntricos e micro-concêntricos. O sistema foi avaliado para metalotioneínas obtidas após a extração e a purificação de uma cianobactéria *Synechococcus* sp PCC7942.

A poluição ambiental causada pelas espécies de mercúrio deve-se à sua aplicação na mineração e na produção de pesticidas, aparatos elétricos, tintas e na área odontológica. O conhecimento acerca da mobilidade de mercúrio no ambiente incentivou as pesquisas relacionadas com os compostos iônicos desse elemento. Assim, Lee e Jiang<sup>43</sup> empregaram um nebulizador micro-concêntrico e um conector em forma de cruz para adaptar o eletrodo e permitir a entrada da solução do eletrólito. As espécies orgânicas e inorgânicas de mercúrio foram preparadas a partir da reação de mercúrio com cisteína, que atuava como ligante. Dessa forma, os compostos formados de carga negativa, entre o Hg e o grupo tiol da cisteína, foram separados pela diferença em carga e tamanho. Neste caso, o limite de detecção para as diferentes espécies de mercúrio se situou entre 0,08 e 0,17 µg mL<sup>-1</sup>.

A determinação de metil mercúrio (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>), considerada a espécie mais tóxica de mercúrio, foi realizada em material de referência certificado. Para esse estudo Tu *et al.*<sup>56</sup> propuseram o acoplamento CE-ICP-MS empregando nebulizador de fluxo cruzado e micro-concêntrico. A solução do eletrólito foi introduzida no nebulizador empregando uma peça *T*. Quando empregado o nebulizador micro-concêntrico, foram obtidos limites de detecção de 13,6 ng mL<sup>-1</sup> para CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e 6,0 ng mL<sup>-1</sup> para Hg<sup>2+</sup>. Quando empregado o nebulizador de fluxo cruzado foram obtidos limites de detecção de 149 ng mL<sup>-1</sup> para CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e 112 ng mL<sup>-1</sup> para Hg<sup>2+</sup>. Os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados.

Ainda considerando-se a performance da interface, Schaumlöffel e Prange<sup>57</sup> também propuseram o nebulizador micro-concêntrico para a especificação de arsênio e chumbo em soluções de referência. Nesse caso, foi mantido também o dispositivo em *T* para a introdução da solução auxiliar do eletrólito e adaptação do eletrodo e do capilar eletroforético. A vazão da solução auxiliar foi avaliada entre 2 e 12 µL min<sup>-1</sup>, e a melhor condição para análise foi obtida entre 4 e 6 µL min<sup>-1</sup>. Para implementar o sistema, arsenocolina, arsenobetaína, arsenito, ácido dimetilarsênico, ácido monometilarsênico, trietil chumbo e trimetil chumbo em solução de referência foram separados em um intervalo de tempo < 7 min.

Com relação ao acoplamento CE-HG-ICP-MS, essa não é uma tarefa simples, mas pode ser bastante vantajoso em alguns estudos, como no caso da especificação e análise de compostos inorgânicos e orgânicos. Elementos como As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te, Pd e Au formam hidretos gasosos, à temperatura ambiente, em um meio reductor. O método mais freqüentemente utilizado para a geração de hidreto é a reação com boroidreto de sódio em meio ácido.

**Tabela 1.** Compilação dos trabalhos envolvendo o acoplamento CE-ICP

Analito	Matriz da amostra	Sistema de detecção	Eletrólito	Ref.
Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Sr <sup>2+</sup> Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , As <sup>3+</sup> , As <sup>5+</sup> e Li <sup>+</sup>	Solução de referência Solução de referência	ICP-AES ICP-MS	40 mmol L <sup>-1</sup> de acetato de sódio (pH 8,2) 60 mmol L <sup>-1</sup> de cloreto de cálcio (pH 6,7)	26 26
Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , K <sup>+</sup> , Y <sup>3+</sup> , Co <sup>2+</sup> e Li <sup>+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	13 e 2,7 mmol L <sup>-1</sup> de cloreto de cálcio (pH 6,0)	27
La <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> e Ni <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup>	Solução de referência Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amônio (pH 7,0) 50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,1)	28 28
Cd <sup>2+</sup> e Fe <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína e Ferritin	ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,0)	29
Cd <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,1)	30
Co <sup>2+</sup>	Solução de referência de coenzima B <sub>12</sub>	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,1)	30
As orgânico e inorgânico Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup> e Cu <sup>2+</sup> - EDTA	Solução de referência Solução de referência	ICP-MS ICP-AES	6 mmol L <sup>-1</sup> ácido 2- hidroxiiisobutírico (pH 4,3) 4 mmol L <sup>-1</sup> acetato de sódio (pH 7,2) 5 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	31 32
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,0)	33
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,0)	34
Tl <sup>+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> e Li <sup>+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	10 mmol L <sup>-1</sup> nitrato de amônia e 5 mmol L <sup>-1</sup> fenantrolina (pH 8,75)	35
Se <sup>4+</sup> , Se <sup>6+</sup> e As orgânico e inorgânico	Solução de referência	ICP-MS	2,3 mmol L <sup>-1</sup> ácido piromelítico e 6,5 mmol L <sup>-1</sup> hidróxido de sódio e 1,6 mmol L <sup>-1</sup> trietanolamina e 0,75 mmol L <sup>-1</sup> Hidróxido hexametonio (pH 7,7)	35
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amonio (pH 7,8)	36
Cr <sup>3+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	4 mmol L <sup>-1</sup> cloreto de lantânio (pH 3,0)	39
Cr <sup>3+</sup> e Cr <sup>6+</sup>	Solução de referência	ICP-AES	2 mmol L <sup>-1</sup> acetato de sódio (pH 5,0)	40
Ba <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup> e Cd <sup>2+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	6,55 mmol L <sup>-1</sup> ácido a-hidroxiiisobutírico e 5,0 mmol L <sup>-1</sup> 4-metilbenzilamina	41
Cr <sup>3+</sup> e Cr <sup>6+</sup>	Água de rio	ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> TTAOH (pH 8,0)	42
Hg orgânico e inorgânico	Solução de referência	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 11) e 20 mmol L <sup>-1</sup> SDS e 0,2% (m/v) L-cisteína	43
Hg orgânico e inorgânico	Material certificado de fígado de peixe e pâncreas de lagosta	ICP-MS	25 mmol L <sup>-1</sup> cloreto de cálcio	46
As orgânico e inorgânico	Água mineral	Hg-ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> e 20 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (pH 9,03)	47
As orgânico e inorgânico Se	Água mineral	Hg-ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> e 20 mmol L <sup>-1</sup> ácido bórico (pH 9,03)	48
As orgânico e inorgânico	Erva medicinal da China	Hg-ICP-MS	25 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (pH 6,5)	49
La <sup>3+</sup> , Ce <sup>3+</sup> , Nd <sup>3+</sup> , Sm <sup>3+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Tb <sup>3+</sup> , Dy <sup>3+</sup> , Ho <sup>3+</sup> , Er <sup>3+</sup> , Tm <sup>3+</sup> , Yb <sup>3+</sup> e Lu <sup>3+</sup>	Solução de referência	ICP-MS	4 mmol L <sup>-1</sup> ácido 2- hidroxiiisobutírico	52
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS	5 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amonio (pH 6,0)	53
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína	ICP-MS	5 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amonio (pH 6,0)	54
Cd <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Solução de referência de metalotioneína e proteínas de bactérias	ICP-MS	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris (pH 9,0)	55
Pb orgânico e As orgânico e inorgânico	Solução de referência	ICP-MS	4 mmol L <sup>-1</sup> borato de sódio (pH 9,3)	57
Se e Te orgânico e inorgânico	Proteínas de leveduras	Hg-ICP-MS	20 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> TTAOH (pH 11,0)	62

Magnuson *et al.*<sup>47</sup> quando propuseram o primeiro acoplamento CE-HG-ICP-MS em 1997, implementaram a especificação de quatro espécies de arsênio: As(III), As(V), ácido monometilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsênico (DMA). Posteriormente, o mesmo sistema foi empregado para a especificação de As(III), As(V), MMA, DMA, Se(IV) e Se(VI)<sup>48</sup>. Nesse caso, para 250 nL de amostra os limites de detecção calculados foram 10 e 240 pg para Se(IV) e Se(VI), respectivamente. Para as espécies de arsênio, os limites de detecção obtidos foram 6 ng mL<sup>-1</sup> de As(V), 58 ng mL<sup>-1</sup> de DMA, 9 ng mL<sup>-1</sup> de MMA e 25 ng mL<sup>-1</sup> As(III). Além disso, no trabalho proposto por Tian *et al.*<sup>49</sup>, também para a especificação de As, os limites de detecção obtidos foram 0,60 ng mL<sup>-1</sup> para As(III), 0,41 ng mL<sup>-1</sup> para DMA, 0,42 ng mL<sup>-1</sup> para MMA e 0,34 ng mL<sup>-1</sup> As(V), respectivamente.

O método de geração de hidretos somente é eficiente para espécies metálicas em determinados estados de oxidação. No caso do selênio é o selenio, para o arsênio, a arsina. Assim sendo, é necessário converter Se(VI), selenometionina e as outras espécies de selênio para o Se(IV). A redução de selênio (VI) pode ser realizada com HCl diluído e aquecimento ou HCl concentrado. No entanto, segundo alguns autores a selenometionina e outros compostos orgânicos não formam diretamente hidretos com borohidreto e HCl<sup>58-60</sup>. Recentemente, alguns trabalhos demonstram a possibilidade de gerar hidretos gasosos a partir de metaloaminoácidos diretamente através da geração de hidretos convencional<sup>61,62</sup>. Charterjee e Morita<sup>61</sup> avaliaram o acoplamento do HPLC-HG-ICP-MS para análise de selenometionina em amostras de urina. Em um segundo estudo, Charterjee *et al.*<sup>62</sup> propõem a geração dos hidretos de selenometionina (Semet), selenoetionina e trimetilselênio (TmSe) a partir de NaBH<sub>4</sub> e HCl, usando GC-AED (GC-AED: "Gas Chromatograph with Atomic Emission Detector") e GC-MS (GC-MS: "Gas Chromatography Mass Spectrometry"). Usando estas técnicas foi possível analisar o modelo de fragmentação e sugerir as espécies sendo geradas na geração de hidretos. Os autores sugerem, pelos padrões de fragmentação obtidos, que as espécies dimetilseleneto (DmSe), dimetildiseleneto (DmDSe) e dietildiseleneto (DeDSe) são as predominantemente formadas a partir da geração de hidretos das espécies TmSe, Semet e Seet, respectivamente. O limite de detecção obtido para selenometionina foi de 1,08 µg L<sup>-1</sup>. A possibilidade de se gerar hidretos diretamente de metaloaminoácidos, apresentada por Charterjee e Morita<sup>61</sup>, é uma alternativa atraente para análise tanto dos compostos inorgânicos como orgânicos em uma única análise. Este tipo de estudo é extremamente importante, principalmente em matrizes de fluidos biológicos, alimentos e solos, onde bactérias conseguem biossintetizar selenoaminoácidos que apresentam importantes funções bioquímicas nestes sistemas. Neste sentido, Moraes e Giné<sup>63</sup> vem desenvolvendo um trabalho empregando o acoplamento CE-HG-ICP-MS para a análise de compostos como selenito, selenato, selenometionina, selenoetionina, selenocisteína, telurato, telurito, telurometionina e telurocisteína biossintetizados. Nesse estudo, os compostos de selênio e telúrio são biossintetizados por bactérias e leveduras como a *Pseudomonas fluorescens* e *A. falciforme*.

Na Tabela 1 estão apresentados os trabalhos que envolvem o acoplamento CE-ICP-MS, destacando-se os análises de interesse, a matriz da amostra, o sistema de detecção e o tipo de eletrólito utilizado.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisando os trabalhos aqui relatados percebe-se que é grande a preocupação para o desenvolvimento dos acoplamentos CE-ICP. Recentemente, Timerbaev<sup>64</sup> descreveu os principais problemas relacionados com o emprego de CE nos procedimentos de especificação.

Segundo o autor, pouca atenção é dada normalmente às etapas de preparação das amostras para assegurar a estabilidade das espécies ou evitar os efeitos de matriz. No artigo, também são discutidos aspectos referentes às mudanças que podem ocorrer na especificação durante as análises e os meios adequados para a validação de metodologias que poderão, futuramente, ser empregadas em análises de rotina. Na verdade, a tendência no desenvolvimento de metodologias envolvendo a especificação é obter resultados com perfil confiável das espécies em equilíbrio na amostra real. Além disso, algumas das etapas tediosas de pré-tratamento de amostras poderão ser implementadas em linha como, por exemplo, empregando sistemas de análise em fluxo para a introdução de amostras no sistema CE-ICP, aumentando as potencialidades da aplicação desses sistemas em análises de rotina e processos de controle<sup>65,66</sup>. E ainda, a miniaturização de sistema CE em "microchips" deverá ser explorada para o acoplamento com o ICP-MS. Isso implicaria em novos desenvolvimentos de nebulizadores para possibilitar os acoplamentos. Nesse caso, a grande vantagem de se utilizar sistemas miniaturizados seria o pequeno volume de amostra, picolitros, o que facilita a nebulização da amostra. Em alguns casos, uma montagem a ser proposta seria o capilar da eletroforese acoplado a um outro capilar por onde seria introduzido um pequeno fluxo de gás, necessário para nebulização, minimizando os problemas relacionados com a contra-pressão no capilar. Ou ainda, devido ao pequeno tamanho das gotículas formadas, não seria necessária a utilização da câmara de nebulização e do nebulizador, sendo esta introduzida diretamente no plasma.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido e à *American Chemical Society* pela permissão para reproduzir as figuras apresentadas.

## REFERÊNCIAS

- Merian, E.; *Metals and their Compounds in the Environment*, Ed. VCH: Weinheim, 1991.
- Vela, N. P.; Olson, L.K.; Caruso, J.A.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 585A.
- Lobinski, R.; *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 260A.
- Kagi, J. H. R.; Schaffer, A.; *Biochemistry* **1988**, *27*, 8509.
- Beattie, J. H.; *Talanta* **1998**, *46*, 255.
- Montaser, A.; Golightly, D. W.; *Inductively Coupled Plasmas in Atomic Spectrometry*, VCH: New York, 1992.
- Boumans, P. W. J. M.; *Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1987.
- Olesik, J. W.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 12A.
- Houk, R. S.; *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 97A.
- Jarvis, K. E.; Gray, A. L.; Houk, R.S.; *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Chapman and Hall: New York, 1991.
- Evans, E. H.; Giglio, J. J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1993**, *8*, 1.
- Heumann, K. G.; Gallus, S. M.; Rädlinger, G.; Vogl J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13*, 1001.
- Subert, A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *350*, 210.
- Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 173.
- Baker, D. R.; *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons Inc.: New York, 1995.
- Kuhn, R.; Hoffstetter-Khun, S.; *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag: New York, 1993.
- Harrold, M. P.; Wajtusik, M.J.; Riviello, J.; Henson, P.; *J. Chromatogr.* **1993**, *640*, 463.
- Bondoux, G.; Jandik, P.; Jones, W. R.; *J. Chromatogr.* **1992**, *602*, 79.
- Huang, X.; Zare, R. N.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2193.
- Terabe, S.; Yashima, T.; Tanaka, N.; Araki, M.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1673.
- Brumley, W. C.; *J. Chromatogr.* **1992**, *603*, 267.
- Lauer, H. H.; McManigill, D.; *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 166.
- Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298.
- Richards, M. P.; Beattie, J. H.; *J. Capillary Electrophor.* **1994**, *1*, 196.

25. Vogt, C.; Werner, G.; *J. Chromatogr.* **1994**, 686, 325.
26. Olesik, J. W.; Kinzer, J. A.; Olesik, S.V.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1.
27. Kinzer, J. A.; Olesik, J. W.; Olesik, S.V.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3250.
28. Majidi, V.; Miller-Ihli, N.J.; *Analyst* **1998**, 123, 803.
29. Lu, G.; Barnes, R. M.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2949.
30. Majidi, V.; Miller-Ihli, N. J.; *Analyst* **1998**, 123, 809.
31. Day, J. A.; Sutton, K. L.; Soman, R. S.; Caruso, J. A.; *Analyst* **2000**, 125, 819.
32. Mei, E.; Ichihashi, H.; Gu, W.; Yamasaki, S.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2187.
33. Polec, K.; Mounicou, S.; Chassaigne, H.; Lobinski, R.; *Cell. Mol. Biol.* **2000**, 46, 221.
34. Ackley, K. L.; Day, J. A.; Caruso, J. A.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 888, 293.
35. Liu, Y.; Avila-Lopes, V.; Zhu, J. J.; Wiederin, D.R.; Beckert, W.F.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2020.
36. Lu, Q.; Barnes, R. M.; *Microchem. J.* **1996**, 54, 126.
37. Olesik, J. W.; Fister, J. C.; *Spectrochim. Acta, Part B* **1991**, 46, 851.
38. Olesik, J. W.; Hobbs, S. E.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3371.
39. Stewart, I. I.; Olesik, J. W.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 872, 227.
40. Chan, Y. Y.; Chan, W. T.; *J. Chromatogr., A* **1999**, 853, 141.
41. Tangen, A.; Lund, W.; Josefsson, B.; Borg, H.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 826, 87.
42. Gervasio, A. P. G.; Lavorante, A. F.; Giné, M. F.; Carrilho, E.; Beloti, D.; *Resumos do 11º Encontro Nacional em Química Analítica*, Campinas, Brasil, 2001.
43. Lee, T. H.; Jiang, S. J.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, 413, 197.
44. Baker, S. A.; Miller-Ihli N. J.; *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 471.
45. Taylor, K. A.; Sharp, B. L.; Lewis, D. J.; Crews, M. H.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, 13, 1095.
46. B'Hymer, C.; Day, J. A.; Caruso, J.A.; *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 1040.
47. Magnuson, M. L.; Creed, J. T.; Brockoff, C. A.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, 689.38.
48. Magnuson, M. L.; Creed, J. T.; Brockoff, C. A.; *Analyst* **1997**, 122, 1057.
49. Tian, X. D.; Zhuang, Z. X.; Chen, B.; Wang, X. R.; *Atom. Spectrosc.* **1999**, 20, 127.
50. Sena, M. M.; Collins, C. H.; Collins, K. E.; Scarminio, I.S.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 331.
51. Rottmann, L.; Heumann, K. G.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3709.
52. Sutton, K. L.; B'Hymer, C.; Caruso, J. A.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, 13, 885.
53. Mounicou, S.; Polec, K.; Chassaigne, H.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 635.
54. Chassaigne, H.; Mounicou, S.; Casiot, C. M.; Lobinski, R.; Potin-Gautier, M.; *Analisis*, **2000**, 28, 357.
55. Lavorante, A. F.; Giné, M. F.; Gervasio, A. P. G.; *Resumos do 7º Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, Florianópolis, Brasil, 2002.
56. Tu, Q.; Qvarnström, J.; Frech, W.; *Analyst* **2000**, 125, 705.
57. Schaumloffel, D.; Prange, A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 364, 452.
58. Pyrzyńska, K.; *Analyst* **1996**, 121, 77R.
59. Gonzalez-Lafuente, J. M.; Fernandez-Sanchez, M. L.; Sanz-Mendel, A.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 1163.
60. Hen, E. L.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 428.
61. Chatterjee, A.; Morita, Y.S.; *Microchem. J.* **2001**, 69, 179.
62. Chatterjee, A.; Shibata, Y.; Yoneda, M.; Banerjee, R.; Uchida, M.; Kon, H.; Morita, M.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3181.
63. Moraes, M. C. B.; Giné, M.F.; trabalho não publicado.
64. Timerbaev, A. R.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, 433, 165.
65. Miranda, C. E. S.; Carrilho, E.; Gervasio, A. P. G.; Giné, M. F.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 412.
66. Giné, M. F.; Gervasio, A. P. G.; Lavorante, A. F.; Miranda C. E. S.; Carrilho, E.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, 17, 736.