UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUANA BASTOS SANTOS

APLICAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO DE GALINHA EM SISTEMA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO

JEQUIÉ - BA

MAIO / 2017

LUANA BASTOS SANTOS

APLICAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO DE GALINHA EM SISTEMA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

JEQUIÉ - BA

MAIO / 2017

S237a Santos, Luana Bastos.

Aplicação da membrana da casca do ovo de galinha Em sistema de extração em fase sólida para Especiação de arsênio / Luana Bastos Santos.- Jequié, 2018.

51f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos e co-orientação do Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB –Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

LUANA BASTOS SANTOS

Aplicação da membrana da casca do ovo de galinha em sistema de extração em fase sólida para especiação de arsênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos (UFBA, Salvador-BA, 2001)
(Orientador)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UFMG, Belo Horizonte-MG, 2012)
(Coorientador)

Profa. Dra. Anaildes Lago de Carvalho (UFBA, Salvador-BA, 2014)

Prof. Dr. Clarivaldo Santos Sousa (UFBA, Salvador-BA, 2005)

Este trabalho é dedicado à minha mãe
Rosélia pelo incentivo, apoio constate
e pleno amor a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por está sempre comigo me guiando e me protegendo.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e do curso de mestrado.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Valfredo Azevedo Lemos pela paciência, pelo tempo de dedicação e ensinamentos, por aceitar fazer parte de um trabalho comigo mais uma vez, agradeço não somente por ser um grande professor, mas, se necessário, ser amigo e conselheiro.

Ao Prof. Djalma Menezes de Oliveira pelos grandes ensinamentos (esse homem conhece de tudo um pouco).

Agradeço a minha mãe Rosélia pela dedicação e amor incondicional a mim, que mesmo distante é como se estivesse sempre aqui todos os dias e ao meu pai Lourival.

Um agradecimento especial a família Soares pelo apoio e incentivo, é quem vem me acompanhando de pertinho nessa trajetória.

Ao LQA pela realização deste trabalho em especial a Márcio José, pela atenção e apoio sempre que necessário.

A Lauro José, Cheilane Tavares e Juliana Lago pelo caminho que percorremos juntos e pela grande amizade que construímos.

Ao Programa de Pós Graduação em Química – UESB Jequié.

“Quando queres realmente uma coisa,

todo o Universo conspira para

ajudar-te a conseguí-la.”

PAULO COELHO

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. ESM nas diversas etapas do preparo. (A) casca de ovo bruta imersa em HNO_3 15%; (B) ESM lavada; (C) ESM seca; (D) ESM triturada. 11

Figura 2. Sistema de pré-concentração.....12

Figura 3. Espectro de infravermelho por transformada de Fourier da ESM. 14

Figura 4. Temperatura de atomização e pirólise.....16

Figura 5. Tipo de eluente na pré-concentração dos íons As.....17

Figura 7. Concentração de etanol na pré-concentração dos íons As.....18

Figura 8. (A) Volume de eluente na pré-concentração de ions As. (B) Fração de eluente na pré-concentração de ions As. 19

Figura 9. Efeito da vazão na pré-concentração dos íons As.....20

Figura 10. Efeito do volume de amosta na pré-concentração dos íons As. 21

Figura 11. Efeito do pH na pré-concentração dos íons As.....22

Figura 12. Concentração de APDC na pré-concentração dos íons As. 23

Figura 13. Curva analítica correspondente ao sistema de pré-concentração e determinação de arsênio.....26

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Trabalhos publicados utilizando a ESM como adsorvente. 6

Tabela 2. Programação de temperatura do forno de grafite para determinação de As por ET ASS. 10

Tabela 3. Condições otimizadas para a pré-concentração e determinação de As(III). 24

Tabela 4. Estudo da interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio.....24

Tabela 5. Estudo da interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio.....25

Tabela 6. Dados referentes às curvas analítica. A: absorvância; C: concentração de As(III) ou As(V), µg L^{-1} 26

Tabela 7. Teores de As(III) em amostras de água e o valor de recuperação. ND: não detectado. 28

Tabela 8: Teores de As(III), As(V) e As total em amostras de água e valor de recuperação. ND: não detectado.....29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APDC: Pirrolidino ditiocarbamato de amônio

CNFs: Nanofibras de carbono

CRM: Material de referência certificado, do inglês *certified reference material;*

ESM: Membrana da casca de ovo, do inglês *eggshell membrane*;

ET AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *electrotermal atomization atomic absorption espectrometry;*

GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption espectrometry;*

HG AFS: Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto, do inglês *Hydride generation atomic fluorescence spectrometry;*

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry;*

LOD: Limite de detecção, do inglês *limit of detection;*

LOQ: Limite de quantificação, do inglês *limit of quantification;*

NIST: National Institute of Standards and Technology;

PTFE: Politetrafluoroetileno, do inglês *polytetrafluoroethylene;*

SD: Desvio padrão, do inglês *standard deviation;*

SPE: Extração em fase solida, do inglês *solid phase extraction*

RSD: Desvio padrão relativo

OMS: Organização Mundial de Saúde

Aplicação da membrana da casca do ovo de galinha em sistema de extração em fase sólida para especiação de arsênio

Autor: Luana Bastos Santos
Orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos
Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

RESUMO: Este trabalho é baseado na aplicação da membrana da casca de ovo (ESM) de galinha *in natura* como sorvente em um procedimento de extração em fase sólida para especiação de arsênio com detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). A ESM pode adsorver vários íons de metais pesados a partir de solução aquosa diluída com uma afinidade elevada e em curto tempo de contato, dependendo do pH e características iônicas, assim torna-se um candidato promissor para adsorvente sólido em sistemas de extração. O procedimento baseia-se na extração em fase sólida do complexo formado pelo As(III) com o pirrolidino ditiocarbamato de amônio (APDC). Soluções de As(III) percolada através da minicoluna preenchida com a membrana da casca de ovo (ESM). Então, o analito contido no sorvente foi dessorvido e transportado por um fluxo de solução de HNO_3 4,0 mol/L e etanol (2:3). A influência de variáveis, tais como eluente (HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3)), volume de amostra, efeito do pH, volume de APDC, volume de eluente, temperatura de atomização e pirólise e vazão de amostra foi estudada. Sob condições otimizadas, o método apresentou limite de detecção, limite de quantificação e fator de enriquecimento de 0,01 µg L^{-1}, 0,03 µg L^{-1} e 17, respectivamente. A especiação de arsênio foi testada, pois As(V) não reage com APDC, mas é retido pela ESM. Desta forma, a determinação de arsênio total e de As(V) possibilita a dosagem de ambas as espécies. O procedimento foi aplicado com sucesso à determinação de espécies de arsênio em amostras de águas naturais. A ESM surge como um sorvente com grande potencial dentro da adsorção de espécies tóxicas.

Palavras-chave: arsênio, membrana da casca de ovo de galinha, extração em fase sólida.

Application of the hen's egg-shell membrane in a solid phase extraction system for arsenic speciation

Author: Luana Bastos Santos
Advisor: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos
Co-Advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

ABSTRACT: This work is based on the use of eggshell membrane (ESM) *in natura* as a sorbent in a solid phase extraction procedure for arsenic speciation with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS). The ESM can adsorb several heavy metal ions from dilute aqueous solution with high affinity and short contact time, depending on pH and ionic characteristics, thus becoming a promising candidate for solid adsorbent in extraction systems. The procedure is based on the solid phase extraction of the species formed by As (III) with ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC). Solutions of As(III) percolated through the minicolumn packed with ESM. Then, the analyte contained in the sorbent was desorbed and carried by a flow of 4,0 mol L^{-1} : HNO_3 solution and ethanol (2: 3). The influence of variables, such as eluent, sample volume, pH effect, APDC volume, eluent volume, atomization and pyrolysis temperature and sample flow was studied. Under optimized conditions, the method presented limit of detection and enrichment factor of 0.01 µg L^{-1} and 17, respectively. Arsenic speciation was also tested because As(V) does not react with APDC, but is retained by ESM. Thus, the determination of total arsenic and As(V) allows the quantification of both species. The procedure was successfully applied to the determination of arsenic species in natural water samples. The ESM appears as a sorbent with a large potential within the extraction of toxic species.

.

Keywords: Arsenic, chicken eggshell membrane, solid phase extraction.

SUMÁRIO

Pag.

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1. Arsênio 1
   1.2. Biossorventes na extração de elementos-traço 2
   1.3. Membrana da casca do ovo em sistemas de extração 4
2. OBJETIVOS 8
   2.1. Objetivo geral 8
   2.2. Objetivos específicos 8
3. PARTE EXPERIMENTAL 9
   3.1. Reagentes e soluções 9
   3.2. Instrumentação 9
   3.3. Obtenção da ESM 10
   3.4. Procedimento para pré-concentração 11
   3.5. Preparo de amostras 12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 14
   4.1. Caracterização da ESM 14
   4.2. Otimização univariada das variáveis 15
      4.2.1. Temperatura de atomização e pirólise 15
      4.2.2. Eluição 16
      4.2.3. Efeito da vazão da amostra 19
      4.2.4. Volume de amostra 20
      4.2.5. Efeito do pH 21
      4.2.6. Concentração de APDC 23
      4.2.7. Resumo das condições experimentais 24
      4.2.8. Interferentes 24
   4.3. Características analíticas 25

4.3.1. Curvas analíticas 25

4.3.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) 26

4.3.3. Fator de enriquecimento (FE) 27

4.3.4. Precisão 27

4.4. Aplicação do método em amostras de água 28

CONCLUSÕES 30

PERSPECTIVAS 31

REFERÊNCIAS 32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arsênio

O arsênio (As) é um metalóide pertencente ao Grupo 15 da Tabela Periódica [1] e é o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre. O arsênio inorgânico tem dois importantes estados de oxidação (As (III) e As (V)). O arsênio inorgânico é mais tóxico do que o arsênio orgânico, e o arsênio trivalente é 25 a 60 vezes mais tóxico do que o pentavalente [2, 3]. Tais substâncias vêm causado uma ameaça potencial para a segurança do ambiente e a saúde humana, devido aos seus efeitos carcinogênicos nos pulmões, rins, fígado, bexiga e sistema nervoso central, doenças cardiovasculares, e alterações dérmicas [4, 5].

Está amplamente disperso no meio ambiente, onde é introduzido principalmente por pesticidas e fertilizantes, resíduos metalúrgicos industriais, fundição e operações de mineração. Isso tem feito o arsênio ser um dos elementos mais abundantes no ambiente, presente principalmente nas cadeias alimentares. Para os seres humanos, as fontes com maior potencial de risco de contaminação por arsênio são a água e os alimentos.

Mais especificamente, uma quantidade de arsênio também pode ser encontrada em peixes de água salgada e frutos do mar. Apenas uma pequena proporção de arsênio derivado de frutos do mar ocorre em formas inorgânicas, a grande maioria é formada por compostos complexos orgânicos. Assim, o consumo de peixes e frutos do mar fornece uma parcela relativamente pequena do arsênio inorgânico na dieta [5, 6]. Em contraste, as fontes dietéticas mais importantes de arsênio inorgânico incluem arroz cru, grãos e farinhas.

Quantidades significativas de arsênio inorgânico são absorvidas quando o arroz, grãos e outros vegetais são cozidos em água contaminada com esse metal. Assim, o arsênio na dieta pode ser categorizado por tipo de arsênio (por exemplo, orgânico e inorgânico) e por fonte (por exemplo, frutos do mar, arroz e grãos) [6]. Determinar cada uma das espécies de arsênio ao invés da quantidade total de arsênio em amostras de água é ambientalmente muito importante.

O nível residual de arsênio na água potável é restringido por algumas das principais políticas de saúde dos governos mundiais. Por exemplo, a Organização

Mundial de Saúde (OMS) limita a concentração máxima de arsênio a 10 μg L^{-1} [7]. Por conseguinte, é importante desenvolver técnicas analíticas eficazes e confiáveis para a determinação de arsênio.

Nos últimos anos, muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para determinar arsênio em água de superfície, águas subterrâneas, águas residuais, mariscos, peixes e em cigarros, incluindo espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG-AAS) [8], espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [9], espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [10], espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), entre outros [5, 11-13]. Entre os métodos acima mencionados, ET AAS foi amplamente utilizado como um método para determinação de arsênio devido à sua sensibilidade adequada, seletividade e ampla faixa dinâmica linear.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é uma das técnicas que atende aos pré-requisitos para determinação de baixas concentrações de elementos, apresentando alta sensibilidade, uma vez que a alíquota da amostra colocada dentro do forno é toda atomizada em um curto período de tempo. Além disso, a técnica apresenta boa seletividade, requer pequenos volumes de amostra e possui limites de detecção, para a maioria dos elementos, em concentrações da ordem de ng L^{-1} e μg L^{-1} [14].

1.2. Biossorventes na extração de elementos-traço

A biossorção é definida como remoção de espécies, compostos e particulados metálicos de uma solução por material biológico (biossorvente) surge como uma alternativa ao processo de adsorção realizado por carvão ativo, PTFE entre outros, pois a mesma consiste num processo de adsorção que se refere à ligação de íons metálicos por biomassa viva ou morta. Considera-se biomassa toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana incluindo os materiais procedentes de suas transformações naturais ou artificiais. Portanto através da biossorção materiais alternativos são utilizados como substitutos [15].

Os biossorventes são preparados a partir da biomassa naturalmente abundante e / ou residual de algas, musgos, fungos ou bactérias que foram mortas,

resíduos industriais, resíduos agrícolas e outros materiais polissacarídeos, para a remoção de metais e corantes. Em geral, todos os tipos de biomateriais têm mostrado boa capacidade de biosorção para todos os tipos de íons metálicos. Portanto, pesquisas sobre biosorção tornaram-se um campo ativo para a remoção de íons metálicos ou compostos orgânicos [16, 17].

Uma grande quantidade de materiais tem sido investigada como biossorventes para a remoção de metais ou orgânicos. Materiais naturais abundantes, particularmente de natureza celulósica, têm sido sugeridos como potenciais biossorventes para a remoção de metais pesados [18-20]. Por razões econômicas, recentemente outros biossorventes de baixo custo têm despertado interesse, como os resíduos agrícolas [21-24].

Neste sentido, vêm sendo introduzidos alguns sorventes de baixo custo, incluindo biomateriais abundantes na natureza ou resíduos industriais e agrícolas, como cascas e resíduos de processamento de alimentos marinhos, biomassa morta, cascas de arroz e casca de ovo, sendo esta última merecedora de atenção especial, pois estão disponíveis a um custo muito baixo e são abundantes. Assim, torna-se um candidato promissor para adsorvente sólido em sistemas de extração devido a características atraentes tais como a área superficial específica elevada e excelente estabilidade química [25].

Os biossorventes podem ser classificados em sorventes de baixo e alto custo. O primeiro grupo inclui os materiais que podem ser coletados diretamente do ambiente, resíduos ou por produtos da indústria. O último grupo inclui os materiais que são especialmente propagados para fins de biossorção. Eles devem ter propriedades biosorventes muito boas e devem ser facilmente regeneráveis [26].

Quando se trata de elementos traços, processos de pré-concentração são essenciais para a obtenção de baixos limites de detecção na determinação de muitas substâncias por diversas técnicas analíticas. Algumas técnicas têm sido bastante usadas com esta finalidade, tais como a extração em fase líquida (LPE), a extração em fase sólida (SPE) e a coprecipitação, entre outras [16, 27].

A SPE tem vários méritos, como o curto tempo de extração, alto fator de enriquecimento, baixo consumo de eluente e fácil automação [28]. Esta técnica tem sido cada vez mais utilizada para a pré-concentração e separação de quantidades ultra-traço de espécies inorgânicas e orgânicas de matrizes complexas [2].

Processos de SPE são dependentes da superfície, uma vez que a sua eficácia depende diretamente no tamanho e a área superficial do sorvente [29].

Nos últimos anos, polímeros naturais têm atraído interesses de pesquisa para aplicação em engenharia de tecidos, células de combustível, separação e biossensor. Recentemente alguns biomateriais, por exemplo, seda, colágeno, membrana interna da casca do bambu e membrana da casca do ovo (ESM), têm atraído bastante interesse. A ESM é um material cuja aplicação tem sido crescente devido à sua composição, estrutura especial, não-toxicidade, baixo custo e fácil obtenção [30].

1.3. Membrana da casca do ovo em sistemas de extração

A ESM é composto por três camadas: ESM externo, ESM interno e membrana limitadora (LM). A ESM e o LM internos podem ser separados mecanicamente; No entanto, o ESM externo está fortemente embutido no ES (cascas) e, em geral, é necessário um tratamento com ácido diluído como o ácido acético ou ácido clorídrico (HCl). Apesar da forte incorporação do ESM externo na ES, a imersão do ES em ácido não o dissolve completamente permite que o ESM seja separado do ES [31].

A ESM é composta principalmente de proteínas fibrosas de colágeno ou proteínas semelhantes, indicando que a matriz orgânica derivada a partir da membrana de casca de ovo não é rígida como minerais inorgânicos [32]. É uma estrutura de rede de fibras estáveis e insolúveis em água com elevada área superficial, situada entre o ES e a clara de ovo.

A ESM é composta principalmente por uma fina camada no interior e uma membrana exterior incluindo proteína típica de colágeno, aminoácidos, sacarídeos e lipídeos, com uma rede de estrutura complexa composta de fibras de proteína insolúveis e estáveis em água. Ela é essencial para a formação de ES e fornece uma plataforma não mineralizada para a mineralização externa da ES, enquanto que, por outro lado, evita a mineralização da clara de ovo [32, 33].

Desde o século passado é observado obras sobre o processo de adsorção onde é relatado o uso de vários adsorventes naturais e sintéticos. No entanto, quando um material biodegradável é utilizado para esta finalidade, o trabalho se

torna importante de um ponto de vista ambiental [34]. Os resíduos da casca de ovo, tendo a propriedade de biodegradabilidade, são um subproduto comum do agregado familiar em todo o mundo. Estes materiais estão disponíveis a um custo muito baixo e são abundantes e podem causar riscos ambientais quando depositados em grande quantidade.

Assim, torna-se um candidato promissor para adsorvente sólido em sistemas de extração devido a características atraentes tais como a área superficial específica elevada e excelente estabilidade química. A ESM pode adsorver vários íons de metais pesados a partir de solução aquosa diluída com uma afinidade elevada e em curto tempo de contato, dependendo do pH e características iônicas [25, 35]. Além de ser um material biológico barato, verde e facilmente alcançado. ESM tem sido aplicada como um adsorvente eficaz para a remoção de metais pesados como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Trabalhos publicados utilizando a ESM como adsorvente.

Fase sólida	Analito	Técnica de detecção	Limite de detecção (ng L^{-1})	Fator de enriquecimento	Amostra	Referência
ESM *in natura*	As (V)	HG AFS	1,0	33,3	Água ambiental	[2]
ESM *in natura*	Cr (VI)	ET AAS	10,0	13,3	Material de referência certificado de água ribeirinha (GBW08608) e água de caverna.	[11]
ESM modificada com polietilenoimina	Cu (II)	FAAS	150,0	100	Ambientais e alimentares	[36]
ESM esterificação com metanol - (MESM)	Especiação de As	GFAAS	15,0	-------	Amostras de água	[37]
ESM – tiol	Especiação de Se	GFAAS	60,0	17,2	Material de referência certificado GBW 09101 (c;.belo humano) e GBW 10010 (arroz) Água mineral e água da chuva	[38]
ESM *in natura*	Cd	GFAAS	130,0	-------	Água ambiental	[39]
ESM *in natura*	Ag	FAAS	-------	-------	Minério	[28]

Continuação. * mg mL^{-1}

Fase sólida	Analito	Técnica de detecção	Limite de detecção (ng L^{-1})	Fator de enriquecimento	Amostra	Referência
ESM *in natura*	Au	ICP-MS	0,92		Geológicas	[35]
ESM *in natura*	Mn (II) e Mn (VII)	ICP-MS	0,031	60	Águas ambientais	[40]
Nanocompósito constituído por proteína de ESM solúvel dopado com óxido de grafeno reduzido	Hg (II)	Voltametria de redissolução anódica.	0.14*	50	Água da torneira	[41]

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Empregar a membrana da casca de ovo de galinha *in natura* como sorvente em um procedimento de extração em fase sólida para determinação de arsênio em amostras biológicas com detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

2.2. Objetivos específicos

i) Obter e preparar a ESM para a utilização como sorvente.

ii) Aplicar a ESM a um sistema de pré-concentração de As (III) e As(V) utilizando a extração em fase sólida.

iii) Otimizar o sistema de extração em fase sólida com detecção por ET AAS.

iv) Utilizar o sistema desenvolvido na determinação de espécies de arsênio em amostras reais de águas naturais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções preparadas com água ultrapura processada por um sistema Elga modelo Purelab Classic. Toda a vidraria usada no procedimento foi previamente descontaminada em banho de ácido nítrico (HNO_3) a 10% v/v por 24 horas e enxaguada com água desionizada. Soluções de HCl e HNO_3 foram preparadas por diluição adequada dos respectivos ácidos concentrados (Merck). Soluções de pirrolidinoditiocarbamato de amônio (APDC) foram preparadas por dissolução da quantidade apropriada do reagente comercial (Sigma-Aldrich) em água ultrapura. Soluções de trabalho de As (III) foram preparadas por diluição da solução estoque (Sigma, 1000 µg/mL).

3.2. Instrumentação

A passagem das soluções pela minicoluna contendo o sorvente foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica de quatro canais modelo BT100LC (Baoding Chuangrui Precision Pump Co., Hebei, China). Um medidor de pH digital BEL (Laboratório de química analítica - UESB), modelo W3B, foi utilizado para as medições de pH. Para aquecimento utilizou-se uma estufa de esterilização e secagem Odontobras modelo El MAX. Os espectros de infravermelho foram obtidos em aparelho da Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR pelo método da refletância atenuada, submetendo 1,0 mg do cristal pulverizado ao feixe de radiação do aparelho. Para as medidas de absorvância utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer (Shelton, USA), modelo Analyst 400, equipado com atomizador de forno de grafite HGA 900 com amostrador automático AS 800 e corretor de fundo com lâmpada de deutério. Uma lâmpada de descarga sem eletrodo de arsênio (Perkin Elmer) foi utilizada como fonte de radiação, operando a uma corrente de 400 mA e comprimento de onda de 173,70 nm. O programa de temperatura do forno de grafite é descrita na Tabela 2. Utilizou-se, também, um

modificador permanente de tungstênio. Os sinais analíticos foram registrados como altura máxima (absorvância).

Tabela 2. Programação de temperatura do forno de grafite para determinação de As por ET ASS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de gás (mL min^{-1})
Secagem 01	100	5	20	250
Secagem 02	140	15	15	250
Pirólise 01	700	10	20	250
Pirólise 02	1200	10	5	250
Atomização	2250	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250

3.3. Obtenção da ESM

A ESM foi obtida através de cascas de ovo de galinha adquiridas em uma lanchonete da cidade de Jequié, Bahia. As cascas foram lavadas em água desionizada e imersas em uma solução de HCl 15% (v/v) durante 12 horas para dissolver a camada externa [41]. Após este período, a ESM foi lavada com água desionizada repetidas vezes. Posteriormente o material foi seco a 50 °C por 1 h em estufa e deve ser triturado imediatamente triturado em liquidificador. A ESM tratada (160 mg) foi, então, inserida em um tubo de PTFE (2,0 mm id 6,0 cm), utilizado como uma minicoluna no procedimento de pré-concentração por extração em fase sólida. A Figura 1 apresenta fotografias da ESM nas diversas etapas do preparo.

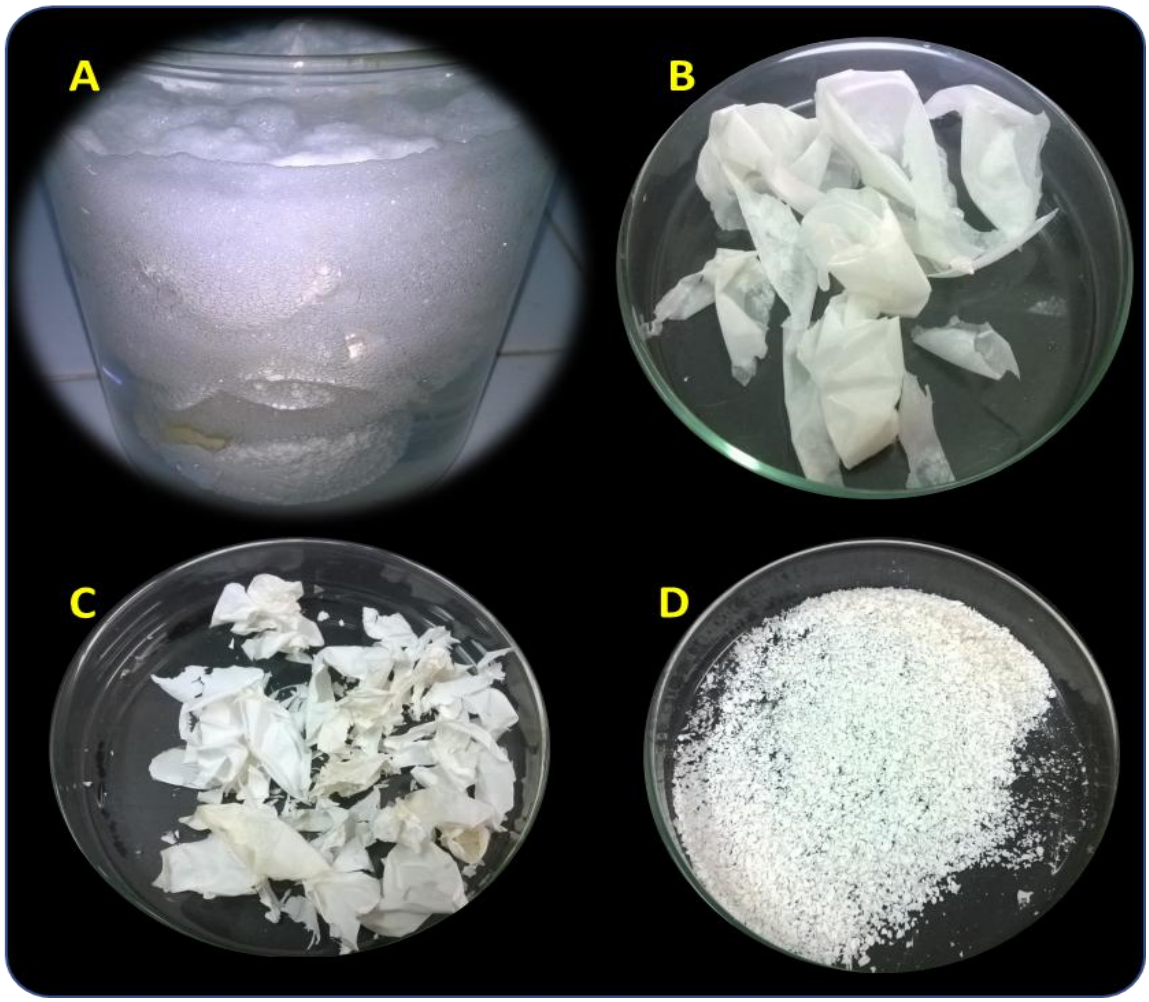

Figura 1. ESM nas diversas etapas do preparo. (A) casca de ovo bruta imersa em HNO_3 15%; (B) ESM lavada; (C) ESM seca; (D) ESM triturada.

3.4. Procedimento para pré-concentração

O procedimento baseia-se na extração em fase sólida do complexo formado pelo As (III) com o APDC. Às amostras e soluções de trabalho contendo arsênio foi adicionado 1,0 mL de solução de APDC a 0,1 % (m/v). Ácido nítrico a 0,10 mol L^{-1} foi utilizado para ajustar o pH para 2,0. O volume final da solução foi completado com água desionizada para 50,0 mL. Com o auxílio da bomba peristáltica, a solução preparada foi percolada através da minicoluna preenchida com a ESM. Após todo o volume de solução passar pelo sorvente, água com pH 2,0 foi utilizada na lavagem da minicoluna, com o objetivo de retirar resíduos provenientes da amostra que poderiam interferir na detecção. Além disso, um fluxo de ar foi posteriormente utilizado para retirar o líquido residual da minicoluna. Após esta etapa, 0,5 mL de

uma solução de eluente foi bombeada pela minicoluna e o eluato contendo arsênio foi coletado em um microtubo de centrífuga. A detecção do elemento foi realizada utilizando-se ET AAS. Após o processo de eluição, a minicoluna foi lavada com água para remover o excesso de acidez, preparando-a para a próxima sequência de extração. A Figura 2 mostra o procedimento.

Figura 2. Sistema de pré-concentração

3.5. Preparo de amostras

As amostras de água foram coletadas no município de Jequié, Bahia, Brasil. As amostras foram filtradas através de um filtro quantitativo de 7-12 µm de porosidade, empregando um sistema de filtração a vácuo.

Para a determinação de As(III), o pH de uma alíquota de 25,0 mL da amostra foi ajustado para 2,0 com solução de ácido nítrico. Então, 1,0 mL de solução de APDC a 0,1 % (m/v) foi adicionado e o volume completado para 50,0mL. As amostras foram submetidas ao processo de pré-concentração e determinação de arsênio. Brancos de reagentes foram preparados de maneira similar às amostras.

O processo para a determinação das espécies de arsênio foi realizado com duas alíquotas de 25,0 mL da mesma amostra. A primeira alíquota, para determinação de arsênio total, teve o pH ajustado para 2,0 com solução de ácido nítrico. Um volume de 5,0 mL de uma solução redutora de iodeto de amônio a 5%

(m/v) foi adicionado. Após 15,0 minutos, 1,0 mL de solução de APDC a 0,1 % (m/v) foi adicionado e o volume completado para 50,0mL. A solução resultante foi, então, submetida ao procedimento de pré-concentração e determinação de arsênio total.

O pH da segunda alíquota foi ajustado para 7,5 com solução de hidróxido de sódio e o volume completado para 50,0 mL com água desionizada. A solução foi percolada pela minicoluna e o processo de pré-concentração e determinação aplicado foi similar àquele da alíquota anterior. No entanto, este processo resultou na determinação de apenas As(V). O teor de As(III) foi, então, obtido por diferença entre os valores obtidos para arsênio total e As(V).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da ESM

A espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada na caracterização da ESM, na faixa de 450 - 4000 cm^{-1}. O dispositivo ATR permite que o espectro seja obtido diretamente da amostra sólida sem necessidade do uso de pastilhas, conforme mostrado na Figura 3. O espectro de infravermelho da ESM pode ser dividido em duas regiões: a primeira entre 3.500 e 2.500 cm^{-1}, e o outro abaixo 1.700 cm^{-1}.

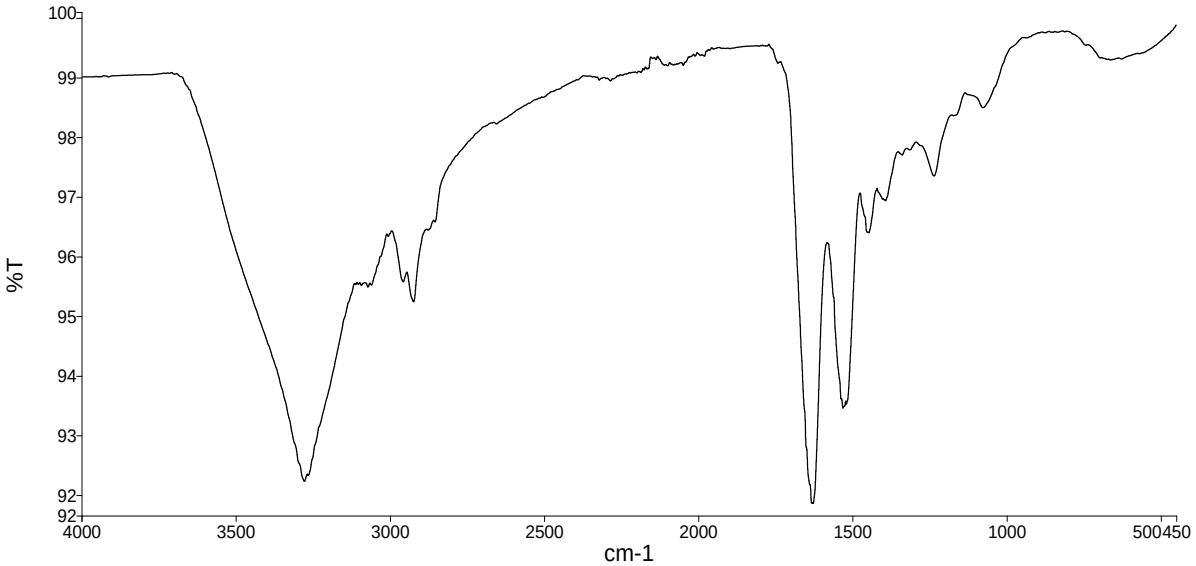

Figura 3. Espectro de infravermelho por transformada de Fourier da ESM.

Na região de comprimento de onda mais elevado, a banda mais intensa é evidenciada a 3280 cm^{-1} o que corresponde presença de grupos O-H e N-H, os picos a 3070, 2958 e 2800 cm^{-1} correspondem a ligações de estiramento C-H. Na região com comprimentos de onda mais baixos, a bandas a 1628 cm^{-1} corresponde a C=O, 1532 cm^{-1} corresponde NC/NH e 1235 cm^{-1} corresponde a CN/NH. Desta forma é evidenciado as presenças de aminas e amidas na partícula da membrana da casca do ovo [11] e [32].

4.2. Otimização univariada das variáveis

Uma solução de As a 1,0 µg L^{-1} foi utilizada na otimização univariada de parâmetros do método empregando o procedimento proposto. A influência de variáveis, tais como eluente, volume de amostra, efeito do pH, volume de APDC, volume de eluente, temperatura de atomização e pirólise e vazão de amostra foi estudada.

4.2.1. Temperatura de atomização e pirólise

Uma alternativa para aumentar a sensibilidade em ET AAS é a otimização das temperaturas de pirólise e atomização. O uso de uma temperatura de pirólise adequada promove a decomposição eficiente da matriz da amostra, evitando a perda de arsênio. Este estudo foi realizado empregando-se o eluente etanol:solução de ácido nítrico 4,0 mol L-1 (3:2), após uma etapa de pré-concentração. Desta forma, foi avaliado o efeito das temperaturas de pirólise e atomização, considerando-se a matriz contendo o arsênio, após a eluição. Neste trabalho, a temperatura de pirólise foi investigada na faixa de 700 a 1700 °C e atomização estudado na faixa de 1900 a 2400 °C. Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que a temperatura de pirólise mais adequada esta próxima de 1200 °C e para a atomização a maior absorvancia foi observado em temperatura de 2250 °C.

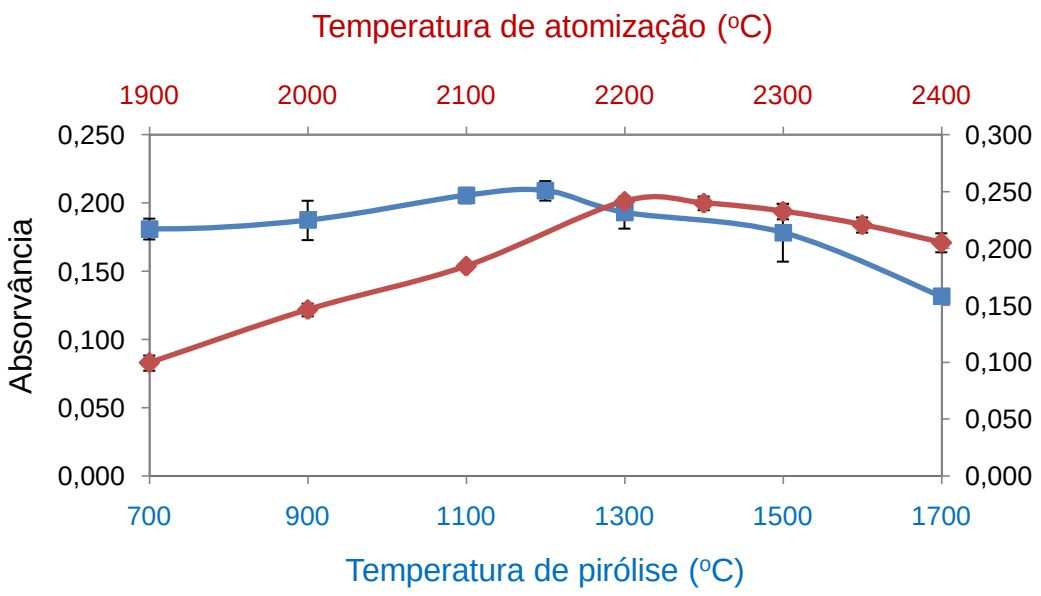

Figura 4. Temperatura de atomização e pirólise.

4.2.2. Eluição

O tipo e o volume da solução a ser usada para a fase de eluição é crucial para alcançar altos fatores de pré-concentração. A ESM retém o complexo formado entre APDC e As (III). A formação deste complexo ocorre na faixa de pH de 1,0 a 4,0. Então, a dessorção na minicoluna deve ser realizada sob condições básicas ou fortemente ácidas. Desta forma, soluções de ácidos minerais, a concentrações de 4,0 mol L^{-1} foram testadas como eluentes. Alguns solventes, como etanol e acetona, também foram testados, pois auxiliam a dissolução dos complexos na fase líquida, facilitando a dessorção. A dessorção promovida por aumento de pH na minicoluna foi testada utilizando-se solução-tampão amoniacal e solução de NH_4OH, mas não foram obtidos resultados significativos.

Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 5. Os solventes etanol e acetona e a mistura HNO_3 4,0 mol L^{-1}: etanol (1:1) proporcionaram os melhores resultados. A utilização da mistura HNO_3 4,0 mol L^{-1}: acetona (1:1) resultou em um sinal analítico bastante próximo dos eluentes anteriores. Os ácidos clorídrico e nítrico, e a solução-tampão amoniacal (em presença ou na ausência de etanol) proporcionaram baixos sinais analíticos.

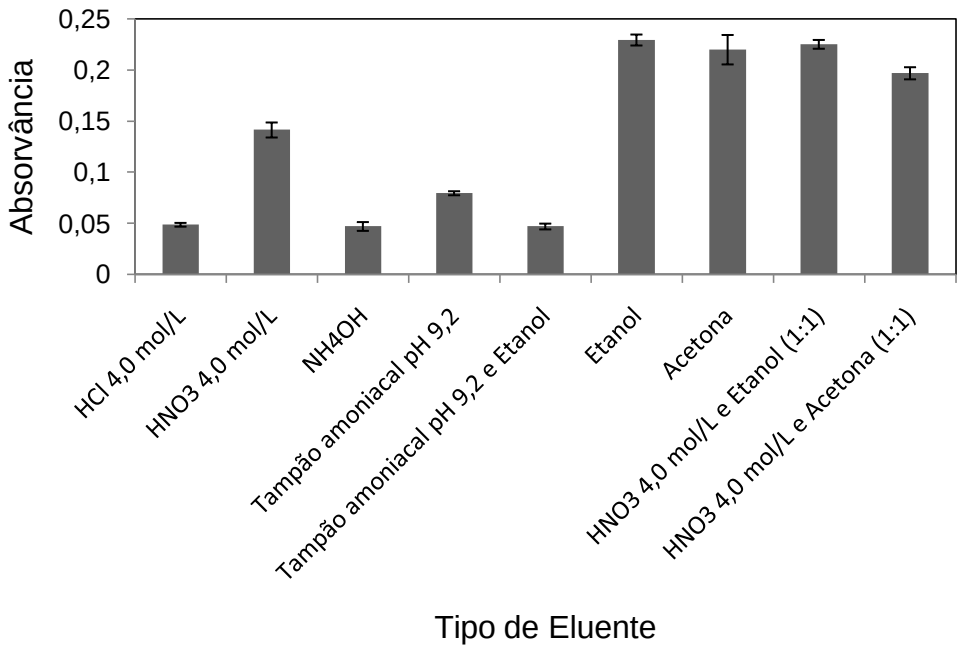

Figura 5. Tipo de eluente na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; agente complexante: 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; pH: 2,0; volume injetado: 50 µL.

Dentre os eluentes que apresentaram os maiores sinais analíticos, a solução HNO_3 4,0 mol L^{-1} : etanol (1:1) apresentou os melhores resultados em termos de perfil do pico de absorção. O bom desempenho da mistura é devido à combinação entre as eficiências do etanol e do ácido nítrico na dissolução do complexo e na mudança de pH, respectivamente. Além disso, a composição da mistura utilizada proporcionou o melhor desempenho na detecção, influenciando positivamente as etapas de secagem, pirólise e atomização, o que foi confirmado pelo perfil do pico de absorção.

Para as espécies de arsênio (As(III), As(V) e As total) foi observado o mesmo comportamento em relação ao tipo de eluente. Após o estabelecimento da mistura HNO_3 4,0 mol L^{-1} : etanol (1:1) como o eluente, o estudo da concentração dos componentes na mistura foi realizado. O estudo foi realizado, considerando-se entre 5,0 a 100,0% de etanol, como mostra a Figura 6.

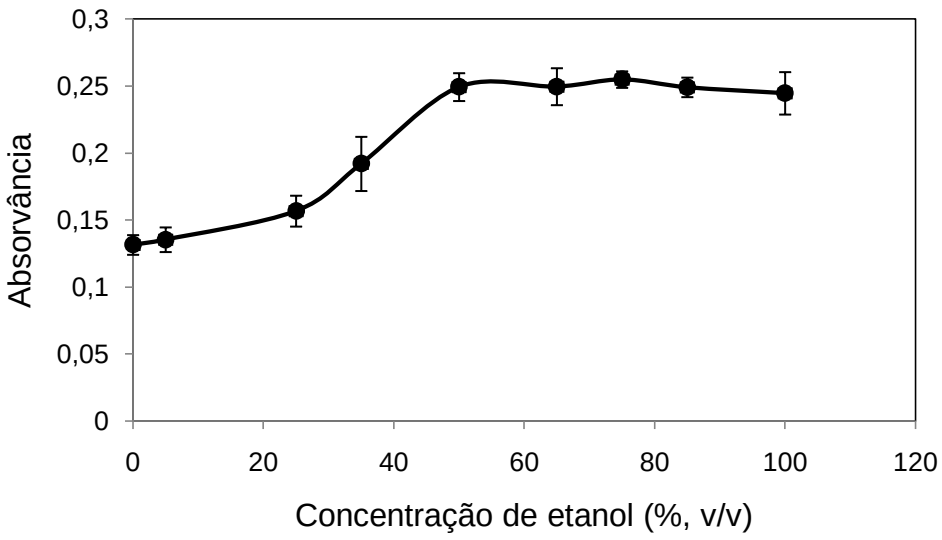

Figura 6. Concentração de etanol na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; agente complexante: 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; pH: 2,0; volume injetado: 50 µL.

O estudo mostrou que a porcentagem de etanol mais adequada para a eluição foi a partir de 50,0%, na qual obtiveram-se as maiores absorvâncias. Acima deste valor, o sinal manteve-se constante. Então, em estudos posteriores, foi fixada uma concentração de etanol a 60,0%, ou seja, foi utilizada uma mistura HNO_3 4,0 mol L^{-1} : etanol (2:3).

Em seguida, o volume de eluente para a dessorção de arsênio (III) na ESM também foi investigado na faixa entre 100 a 3000 µL, como mostrado na Figura 7. Os resultados experimentais mostraram que 500 µL do eluente foram suficientes para dessorver o arsênio na coluna de ESM. Acima de 500 µL, ocorre uma diminuição do sinal analítico, devido ao efeito de diluição; a mesma massa de arsênio é diluída em volumes de eluente gradativamente maiores.

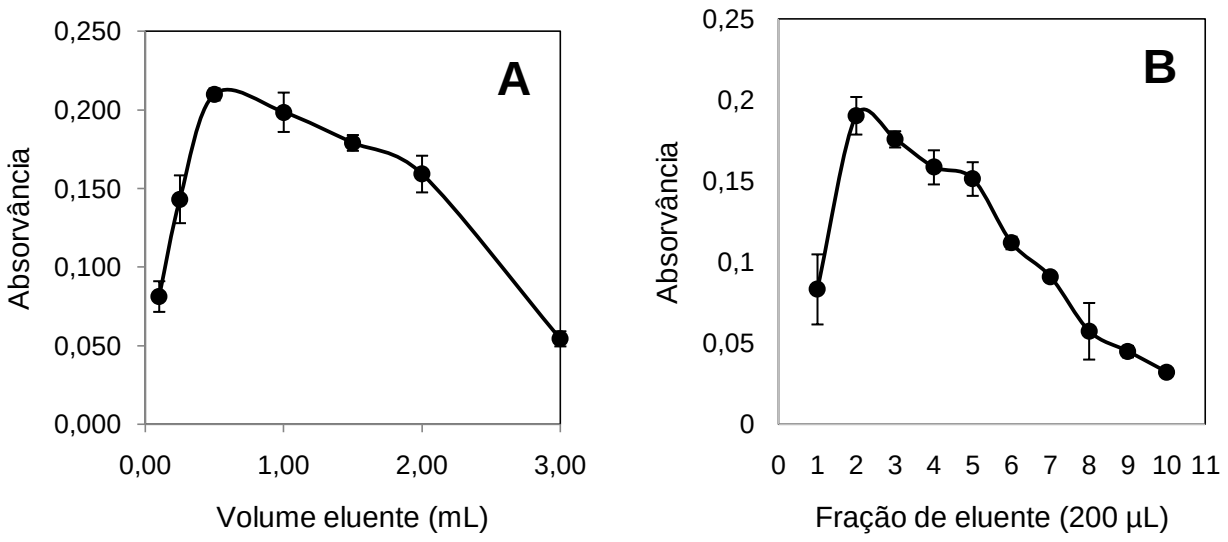

Figura 7. (A) Volume de eluente na pré-concentração de ions As. (B) Fração de eluente na pré-concentração de ions As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; agente complexante: 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; pH: 2,0; eluente: 0,5 mL HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3); volume injetado: 50 µL.

Os experimentos indicaram que nenhuma deterioração do desempenho analítico da minicoluna empacotada com ESM foi encontrado após a eluição. Este desempenho se manteve até 250 etapas de pré-concentração.

4.2.3. Efeito da vazão da amostra

O efeito da vazão da solução amostra sobre a retenção de íons arsênio foi estudado, considerando-se os valores entre 0,26 a 25,0 mL min^{-1}. Os resultados demonstraram que a absorvância diminuiu com o aumento da vazão, conforme é exibido na Figura 8. A absorvância diminuiu quando o fluxo foi maior que 3,5 mL min^{-1} porque, acima deste valor, a velocidade de passagem do analito pela ESM é relativamente alta, o que diminui o tempo de contato entre as fases. Não obstante, a vazões excessivamente baixas, a labilidade das espécies sorvidas promove uma lixiviação, prejudicando a sorção, devido ao maior tempo de passagem da solução-amostra pela minicoluna. Com base nestes resultados, foi escolhida, então, uma vazão de 2,0 mL min^{-1}, para os experimentos posteriores.

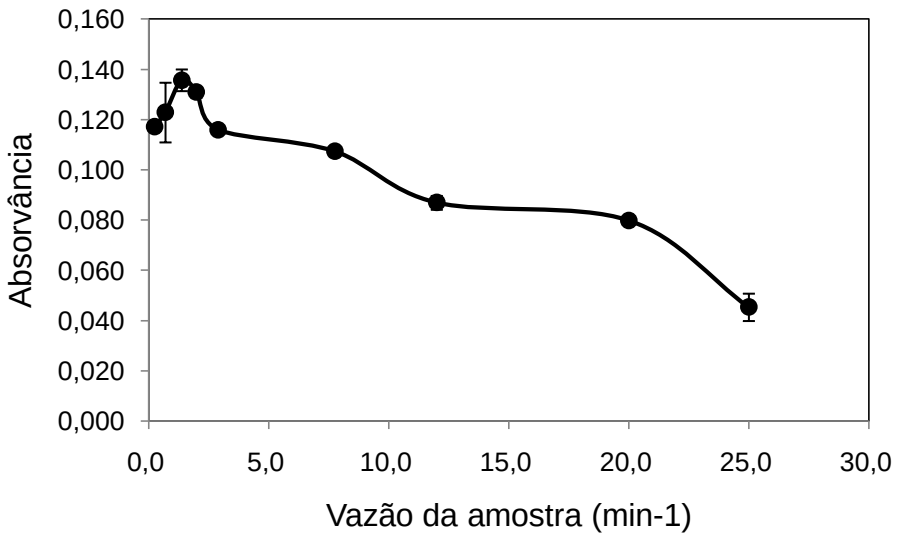

Figura 8. Efeito da vazão na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; agente complexante: 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; pH: 2,0; eluente: 0,5 mL HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3); volume injetado: 50 µL.

4.2.4. Volume de amostra

O efeito do volume da solução de amostra na sorção também foi estudado, utilizando-se volumes variando entre 10,0 e 500mL, com a mesma massa de arsênio para todos os volumes. Os volumes utilizados foram 10, 25, 50, 100, 200, 250 e 500 mL. Os resultados mostraram que a sorção de arsênio foi satisfatória partir de 10,0 até 100,0 mL como mostrado na Figura 9. Acima de 100,0 mL, houve diminuição significativa da absorvância do arsênio. Com volumes de amostra acima de 100,0 mL provavelmente ocorreu o efeito de lixiviação. Então o volume de 50,0 mL foi escolhido para os próximos experimentos.

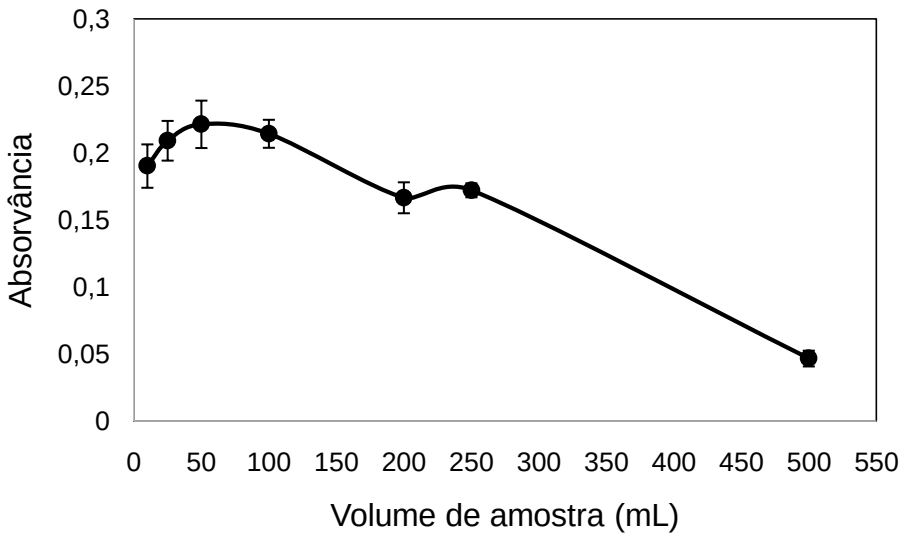

Figura 9. Efeito do volume de amosta na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; agente complexante: 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; pH: 2,0; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; eluente: 0,5 mL HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3); volume injetado: 50 µL.

4.2.5. Efeito do pH

A membrana de casca de ovo tem uma estrutura porosa complexa composta de proteínas, glicolípidos e carboidratos, macromoléculas que contêm um grande número de grupos funcionais como foi mostrado no espectro de infravermelho (-OH, -SH, -COOH e $-NH_2$, etc.) dentro da ESM. O valor de pH desempenha um papel muito importante na separação / pré-concentração de metais, pois afeta a protonação e a desprotonação desses grupos funcionais e das espécies metálicas presentes em meio ácido-base. Um adequado valor de pH pode aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra, e afeta também a formação de complexos.

O As (III) origina complexos estáveis com APDC dentro de uma ampla faixa de valores de pH. Assim o efeito desta variável foi investigado no intervalo de valores entre 0,5 e 10,0. Os resultados mostrados na Figura 10 indicam que a maior quantidade de arsênio extraída foi obtida para valores de pH entre 1,0 e 2,0. Além disso, um rápido declínio do sinal analítico foi observado com um aumento no pH.

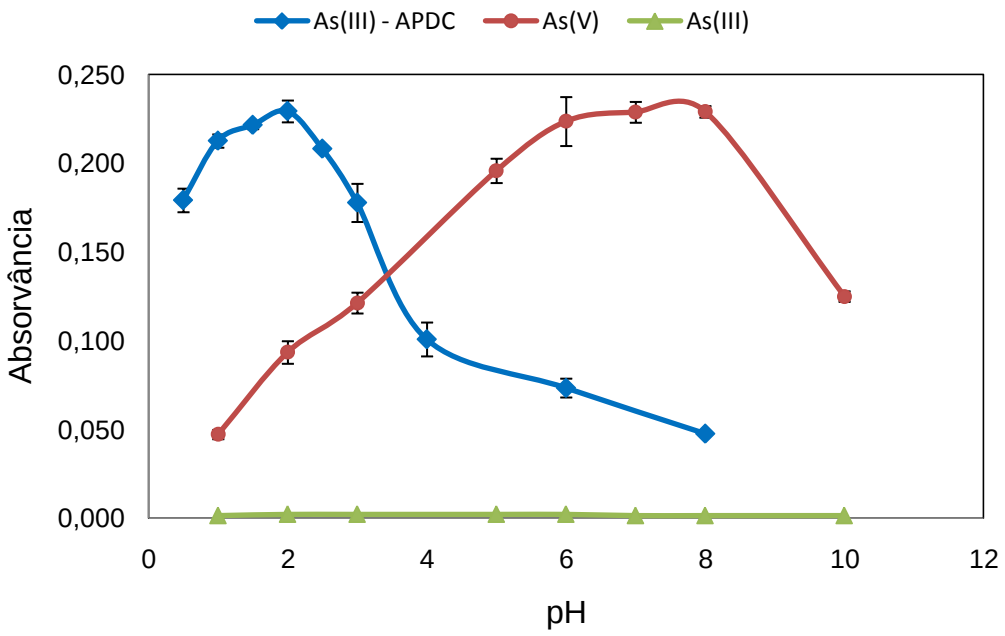

Figura 10. Efeito do pH na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) ou As(V) na solução-amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; agente complexante (quando indicado): 1,0 mL de APDC 0,10% m/v; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; eluente: 0,5 mL HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3); volume injetado: 50 µL.

Para se obter um pH ente 1 e 2, que foi o mais adequado para a extração, foi adicionado 3,0 mL da solução de ácido nítrico 0,1mol/L à solução amostra. Desta forma, obteve-se um pH em torno de 1,8 utilizado em todos os experimentos posteriores, para a determinação de As(III).

A possibilidade da determinação simultânea de As(III) e As(V) foi verificada, através do estudo da sorção destas espécies pela ESM, sem complexação pelo APDC. Os resultados são mostrados na Figura 9. Observa-se que o As(III) não é sorvido pela ESM, a qualquer pH. Desta forma, confirma-se que, para a sorção do As(III) pela ESM, esta na forma complexada presente em solução.

O As(V) não forma complexos com o APDC [25], de forma que a sua sorção foi testada apenas com soluções desta espécie, sem complexação. Os resultados para a sorção de As(V) pela ESM são significativamente diferentes. De acordo com a curva correspondente mostrada na Figura 9, a espécie As(V) é sorvida a uma faixa de pH entre 5,0 e 8,0. Estes resultados viabilizam estudos para a especiação de As(III) e As(V), conforme será apresentado na seção 4.3.

4.2.6. Concentração de APDC

A concentração do APDC deve ser suficiente para complexar o metal de interesse e compensar a complexação de alguns íons interferentes que possam existir na amostra. No entanto, uma concentração excessiva do complexante pode promover a precipitação.

O efeito da concentração APDC foi estudada e os resultados estão apresentados na Figura 11. Este estudo foi realizado empregando-se soluções com concentrações finais de APDC variando entre 0,0 e $4{,}0\times10^{-3}$% (m/v). Os melhores resultados foram observados para concentrações de APDC entre $1{,}0\times10^{-3}$ e $2{,}0\times10^{-3}$ % (m/v). Na ausência de APDC, não houve extração. Observou-se uma diminuição do sinal, para concentrações de APDC acima de $2{,}0\times10^{-3}$. Nos experimentos posteriores, foi empregada uma concentração final de APDC a $1{,}5\times10^{-3}$ % (m/v), de modo a assegurar um excesso suficiente do ligante em caso de presença de outros metais.

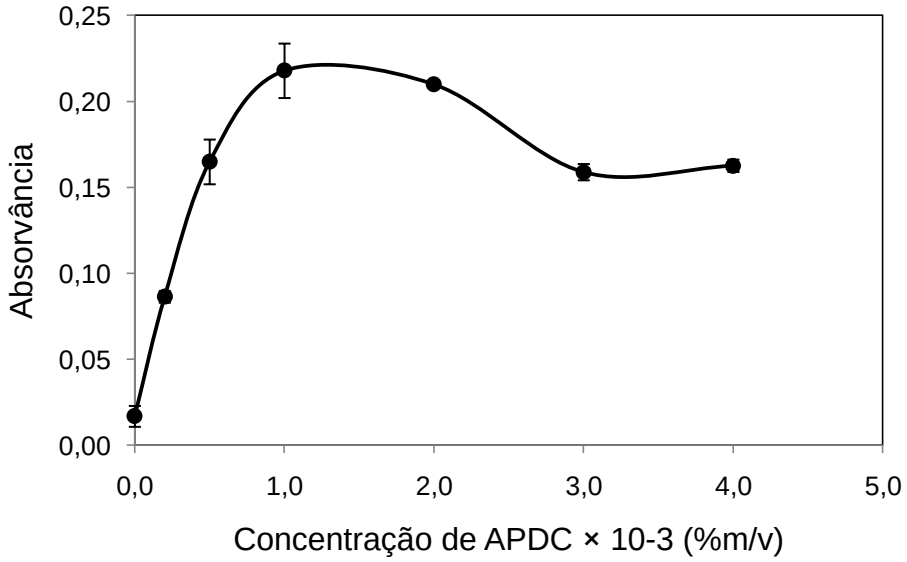

Figura 11. Concentração de APDC na pré-concentração dos íons As.
Concentração de As(III) na solução amostra: 1,0 µg/L; volume da solução de amostra: 50;0 mL; pH: 2,0; vazão da amostra: 2,0 mL min^{-1}; eluente: 0,5 mL HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3); volume injetado: 50 µL.

4.2.7. Resumo das condições experimentais

A tabela 3 apresenta um resumo das condições experimentais para a pré-concentração e determinação de arsênio utilizando a ESM como fase sólida.

Tabela 3. Condições otimizadas para a pré-concentração e determinação de As(III)**.**

Condição	Condição
Modificador permanente	Tungstênio
Temperatura de atomização e pirólise	2250 ^{o}C/1200 ^{o}C
Eluição	0,5 mL (HNO_3 4,0 mol/L e C_2H_6O (2:3))
Vazão da amostra	2 mL min^{-1}
Volume de amostra	50,0 mL
pH As(III) / As(V)	pH 2,0 / 7,5
Concentração de APDC	$1,5\times10^{-3}$ % (m/v)
Volume injetado	50 μL

4.2.8. Interferentes

A possibilidade de interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio foi estudada utilizando-se soluções de As(III) de 1,0 μg L^{-1}. Cada espécie foi adicionada gradativamente a soluções de As(III), e o sinal analítico foi comparado com aquele correspondente ao sinal da solução contendo apenas o arsênio. Uma espécie foi considerada interferente quando o sinal analítico em sua presença variou em ± 10,0% em relação ao sinal do As(III). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Estudo da interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio

Espécie	Proporção limite As(III):espécie
Cl(-I) e Na(I)	1:100
Al(III), Ca(II), K(I), Mg(II), NO_3(-I), Pb(II) e Se(IV)	1:75
Ag(I), Cd, Co(II), Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn	1:50

Foi estudada também a possibilidade de interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio utilizando-se soluções de As(V) de 1,0 μg L^{-1}. Utilizando o procedimento anterior Os resultados para AS(V) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Estudo da interferência causada por alguns íons no processo de extração de arsênio

Espécie	Proporção limite As(V):espécie
Cl(-I) e Na(I)	1:100
Al(III), Ca(II), Mg(II), Pb(II) e Se(IV)	1:100
Ag(I), Cd, Co(II), Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn	1:75
K(I), NO_3(-I)	1:50

4.3. Características analíticas

4.3.1. Curvas analíticas

Após a otimização das variáveis que influenciam o comportamento do sistema de pré-concentração, promoveu-se a obtenção das características analíticas do método. O As(III) pode ser determinado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.4. O As(V) também pode ser determinado utilizando-se as condições do procedimento proposto, exceto o pH, que deve ser ajustado para 7,5, sem adição de APDC. Foram construídas, então, duas curvas analíticas referentes às espécies As(III) e As(V). O gráfico correspondente a estas curvas encontra-se na Figura 11..

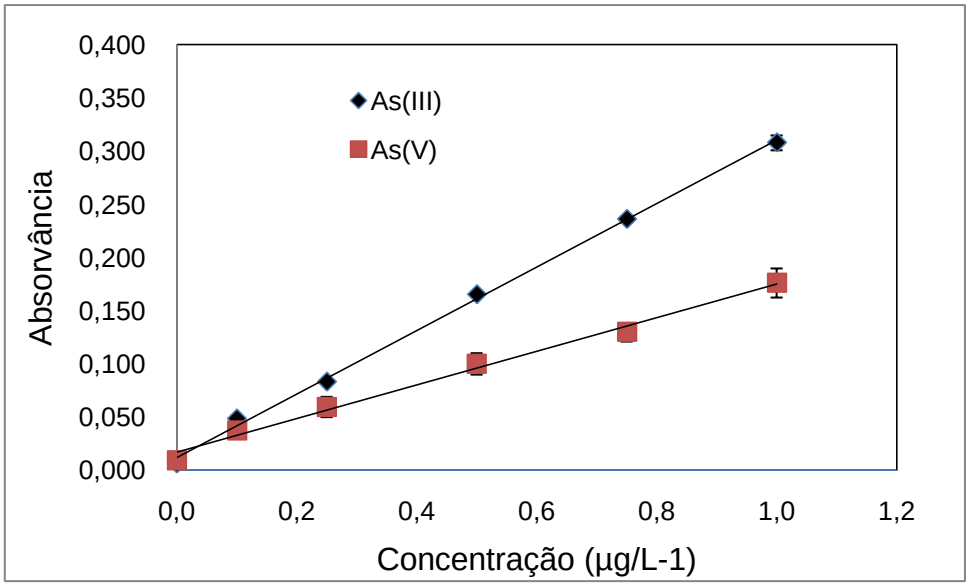

Figura 12. Curva analítica correspondente ao sistema de pré-concentração e determinação de arsênio.

Além disso, uma curva analítica relativa à medida direta de arsênio por ET AAS foi construída, para comparação dos sinais. As características destas curvas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Dados referentes às curvas analítica. A: absorvância; C: concentração de As(III) ou As(V), µg L^{-1}

Parâmetro	Sistema de pré-concentração		Medida direta
	As(III)	As(V)	
Equação da regressão linear	A = 0,2985C + 0,0118	A = 0,1585C + 0,0167	A = 0,0175C + 0,008
Coeficiente de correlação	0,9991	0.9963	0,9986
Faixa de concentração (µg L^{-1})	0,1 – 1,0	0,1 – 1,0	0,1 – 5,0

4.3.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, que é matematicamente expresso como três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de 20 a 30 determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva analítica [3] e [42]. O limite de detecção encontrado para o método proposto foi de 0,01 µg L^{-1}.

$$LD = \frac{3S_{Br}}{b} \qquad \text{Equação 1}$$

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. É matematicamente expresso como dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de 20 a 30 determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva analítica [43] e [42]. O limite de quantificação referente ao método proposto foi de 0,03 µg L^{-1}.

$$LQ = \frac{10S_{Br}}{b} \qquad \text{Equação 2}$$

4.3.3. Fator de enriquecimento (FE)

O fator de enriquecimento é o critério mais utilizado para avaliação dos sistemas de pré-concentração, representa a razão entre a concentração do elemento de interesse na solução obtido após pré-concentração, e a concentração original. Na pratica o FE é aceito pela sua definição como a razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas com pré-concentração e sem etapa de pré-concentração [44].

$$FE = \frac{bp}{bs} \qquad \text{Equação 03}$$

Sendo bp o coeficiente angular da curva de calibração com a etapa de pré-concentração e bs o coeficiente angular da curva de calibração sem a etapa de pré-concentração. O FE estimado foi de 17.

4.3.4. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para

circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão relativo (rsd). A precisão do método proposto variou entre 1,0 e 3,2%, para concentrações de As(III) entre 0,1 e 1,0 µg L^{-1}.

4.4. Aplicação do método em amostras de água

Um número de amostras de água foi submetido ao procedimento recomendado. Devido às concentrações muito baixas envolvidas e para verificar a validade do método, ensaio de recuperação foi realizado.

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula a seguir, em concentrações do analito ≥ 1 o intervalo de recuperação aceito é de 97-103% [45] e [42].

$$\text{Rec \%} = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100 \qquad \text{Equação 04}$$

O método proposto foi aplicado à determinação de espécies de As em amostras reais de água de rio e lagoa. Como pode ser observado na Tabela 7 as recuperações para As(III) nas amostras de água foram de 98 a 112%, o que demonstra que o método proposto foi satisfatório para análise de arsênio.

Tabela 7. Teores de As(III) em amostras de água e o valor de recuperação. ND: não detectado.

Amostra	Teor de As(III) (µg L^{-1})		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Água de rio 1	0,0	0,11 ± 0,02	106,00
	0,5	0,64 ± 0,04	
Água de rio 2	0,0	ND	104,00
	0,5	0,52 ± 0,02	

Água de rio 3	0,0	0,12 ± 0,01	98,00
	0,5	0,61 ± 0,02	
Água de rio 4	0,0	ND	98,00
	0,5	0,49 ± 0,01	
Água de rio 5	0,0	ND	112,00
	0,5	0,56 ± 0,01	
Água de lagoa	0,0	ND	100,00
	0,5	0,50 ± 0,03	

Além disso, foram realizadas experiências de recuperações para As(III), As(V) e As total em outras amostras de água. As quantidade de arsênio foi obtida seguindo o procedimento descrito na seção 3.4, os resultados estão apresentados na Tabela 8. Indicando que as recuperações foram razoáveis, variando de 94-108%.

Tabela 8: Teores de As(III), As(V) e As total em amostras de água e valor de recuperação. ND: não detectado.

Amostra	**Teor de As**					**Recuperação (%)**	
	Adicionado ($\mu g\ L^{-1}$)		**Encontrado ($\mu g\ L^{-1}$)**				
	As(III)	**As(V)**	**As(III)**	**As(V)**	**Total**	**As(III)**	**As(V)**
Água de rio 6	0,0	0,0	0,24 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,62 ± 0,03	94	97
	0,5	0,5	0,71 ± 0,03	0,87 ± 0,03	1,58 ± 0,05		
Água de rio 7	0,0	0,0	ND	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,03	108	106
	0,5	0,5	0,54 ± 0,03	0,98 ± 0,04	1,52 ± 0,02		

CONCLUSÕES

Neste estudo foi proposto um biomaterial natural baseado em ESM como um adsorvente de extração em fase sólida para a determinação de As por ET AAS. A ESM proporcionou um procedimento novo e eficaz para a separação e pré-concentração do As. Foi verificado uma alta capacidade de adsorção para as espécies de arsênio. Num meio altamente ácido o As(III) foi pré-concentrado da matriz da amostra para ESM.

Os parâmetros otimizados, tais como: eluente, volume de amostra, efeito do pH, volume de APDC, volume de eluente, temperatura de atomização e pirólise e vazão de amostra melhoraram a eficiência da extração dos íons As. Sob essas condições otimizadas, o método apresentou limite de detecção e fator de enriquecimento satisfatórios para a determinação arsênio.

O proposto estudo apresentou alta sensibilidade e boa reprodutibilidade para arsênio. Além disso, o adsorvente baseado em ESM é barato, ambientalmente benigno e biodegradável. Acredita-se que a membrana da casca de ovo pode ser útil em SPE para adsorver outros poluentes. Entre as principais vantagens do método estão a sua simplicidade, baixo custo e a abordagem ambientalmente correto devido ao uso de um material não tóxico.

Alem disso a ESM possibilitou a quantificação de As(V) em meios menos acido (pH 7,5) sem a presença de um complexante. Ainda foi possível realizar a especiação de arsênio utilizando uma solução redutora de iodeto de amônio a 5% para redução de As(V) a As(III).

PERSPECTIVAS

Aplicabilidade do método em amostras reais de mariscos e cigarro.

Propor aplicabilidade do método para determinação de selênio [Se(IV) e Se(VI)].

Propor aplicabilidade do método com ESM não modificado e modificados, preparados a partir dos subprodutos da ESM para determinação de arsênio [As(III) e As(V)] e selênio [Se(IV) e Se(VI)].

REFERÊNCIAS

(1) WILSON, S.C., LOCKWOOD, P.V., ASHLEY, P.M. AND TIGHE, M., The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review. **Environmental Pollution**, v.158, n.5, p.1169-1181, 2010.

(2) ZHANG, Y., WANG, W., LI, L., HUANG, Y. AND CAO, J., Eggshell membrane-based solid-phase extraction combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry for trace arsenic (V) in environmental water samples. **Talanta**, v.80, n.5, p.1907-1912, 2010.

(3) LIANG, P., PENG, L. AND YAN, P., Speciation of As (III) and As (V) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction separation and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v.166, n.1-2, p.47-52, 2009.

(4) LIN, M. AND LIAO, C., Assessing the risks on human health associated with inorganic arsenic intake from groundwater-cultured milkfish in southwestern Taiwan. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.701-709, 2008.

(5) ZMOZINSKI, A.V., LLORENTE-MIRANDES, T., LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F. AND DA SILVA, M.M., Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. **Food chemistry**, v.173, p.1073-1082, 2015.

(6) MASOTTI, A., DA SACCO, L., BOTTAZZO, G.F. AND STURCHIO, E., Risk assessment of inorganic arsenic pollution on human health. **Environmental pollution**, v.157, n.6, p.1771-1772, 2009.

(7) BORAK, J. AND HOSGOOD, H.D., Seafood arsenic: implications for human risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, n.2, p.204-212, 2007.

(8) EDITION, F., Guidelines for drinking-water quality. **WHO chronicle**, v.38, p.104-108, 2011.

(9) ULUOZLU, O.D., TUZEN, M., MENDIL, D. AND SOYLAK, M., Determination of As (III) and As (V) species in some natural water and food samples by solid-phase extraction on Streptococcus pyogenes immobilized on Sepabeads SP 70 and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Food and chemical toxicology**, v.48, n.5, p.1393-1398, 2010.

(10) AFRIDI, H.I., TALPUR, F.N., KAZI, T.G. AND BRABAZON, D., Effect of Trace and Toxic Elements of Different Brands of Cigarettes on the Essential Elemental Status of Irish Referent and Diabetic Mellitus Consumers. **Biological trace element research**, v.167, n.2, p.209-224, 2015.

(11) ZOU, A.-M., CHEN, X.-W., CHEN, M.-L. AND WANG, J.-H., Sequential injection reductive bio-sorption of Cr (VI) on the surface of egg-shell membrane and chromium speciation with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.23, n.3, p.412-415, 2008.

(12) ANEZAKI, K., NUKATSUKA, I. AND OHZEKI, K., Determination of Arsenic (III) and Total Arsenic (III, V) in Water Samples by Resin Suspension Graphite Furnace Atomic Absorption Specctrometry. **Analytical Sciences**, v.15, n.9, p.829-834, 1999.

(13) LIANG, P., PENG, L. AND YAN, P., Speciation of As(III) and As(V) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction separation and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v.166, n.1, p.47-52, 2009.

(14) PEREIRA, É.R., DE ALMEIDA, T.S., BORGES, D.L., CARASEK, E., WELZ, B., FELDMANN, J. AND DEL CAMPO MENOYO, J., Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution

continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.150, p.142-147, 2016.

(15) RIBEIRO, A.S., ARRUDA, M.A.Z. AND CADORE, S., Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio. Uma revisão crítica. **Química Nova**, v.25, n.3, p.396-405, 2002.

(16) CHOJNACKA, K., Biosorption and bioaccumulation–the prospects for practical applications. **Environment international**, v.36, n.3, p.299-307, 2010.

(17) KRATOCHVIL, D. AND VOLESKY, B., Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in biotechnology**, v.16, n.7, p.291-300, 1998.

(18) ALLER, A. AND CASTRO, M., Live bacterial cells as analytical tools for speciation analysis: Hypothetical or practical? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n.9, p.887-898, 2006.

(19) BIANCHIN, J.N., MARTENDAL, E., MIOR, R., ALVES, V.N., ARAÚJO, C.S.T., COELHO, N.M.M. AND CARASEK, E., Development of a flow system for the determination of cadmium in fuel alcohol using vermicompost as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.78, n.2, p.333-336, 2009.

(20) PACHECO, P.H., GIL, R.A., CERUTTI, S.E., SMICHOWSKI, P. AND MARTINEZ, L.D., Biosorption: a new rise for elemental solid phase extraction methods. **Talanta**, v.85, n.5, p.2290-2300, 2011.

(21) CHEN, C. AND WANG, J., Removal of Pb 2+, Ag+, Cs+ and Sr 2+ from aqueous solution by brewery's waste biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v.151, n.1, p.65-70, 2008.

(22) SOUZA, F.E.D., Remoção de Corantes de Efluentes Industriais Utilizando Resíduos Agrícolas como Biossorventes. 2012.

(23) SALAVERRY, I.B., DOS SANTOS, F.A. AND FRANKENBERG, C.L.C., Uso de resíduos da produção de azeite de oliva como biossorventes de cromo hexavalente. **Revista Liberato**, v.17, n.27, 2016.

(24) MIMURA, A.M.S., VIEIRA, T.D.A., MARTELLI, P.B. AND GORGULHO, H.D.F., Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu2+, Al3+, Ni2+ e Zn2+. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1279-1284, 2010.

(25) ARAMI, M., LIMAEE, N.Y. AND MAHMOODI, N.M., Investigation on the adsorption capability of egg shell membrane towards model textile dyes. **Chemosphere**, v.65, n.11, p.1999-2008, 2006.

(26) WANG, J. AND CHEN, C., Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology advances**, v.27, n.2, p.195-226, 2009.

(27) ANTHEMIDIS, A.N. AND MARTAVALTZOGLOU, E.K., Determination of arsenic (III) by flow injection solid phase extraction coupled with on-line hydride generation atomic absorption spectrometry using a PTFE turnings-packed micro-column. **Analytica chimica acta**, v.573, p.413-418, 2006.

(28) CHENG, X., SHAO, K., SHEN, S., HU, S. AND QIU, H., Determination of Trace Silver in Polymetallic Ore Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Solid-Phase Extraction Using a Microcolumn Comprising Eggshell Membrane. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v.35, n.4, p.461-469, 2011.

(29) FRITZ, J.S. AND MACKA, M., Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.902, n.1, p.137-166, 2000.

(30) BEHBAHANI, M., HASSANLOU, P.G., AMINI, M.M., OMIDI, F., ESRAFILI, A., FARZADKIA, M. AND BAGHERI, A., Application of solvent-assisted dispersive solid phase extraction as a new, fast, simple and reliable preconcentration and trace detection of lead and cadmium ions in fruit and water samples. **Food chemistry**, v.187, p.82-88, 2015.

(31) XUE, G., YUE, Z., BING, Z., YIWEI, T., XIUYING, L. AND JIANRONG, L., Determination of ascorbic acid using CdTe quantum dots immobilized on eggshell membrane surface as a turn-on fluorescence probe. **Journal of Luminescence**, v.180, p.146-150, 2016.

(32) BALÁŽ, M., Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. **Acta biomaterialia**, v.10, n.9, p.3827-3843, 2014.

(33) TSAI, W., YANG, J., LAI, C., CHENG, Y., LIN, C. AND YEH, C., Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. **Bioresource technology**, v.97, n.3, p.488-493, 2006.

(34) GURU, P.S. AND DASH, S., Sorption on eggshell waste—a review on ultrastructure, biomineralization and other applications. **Advances in colloid and interface science**, v.209, p.49-67, 2014.

(35) CHENG, X., LIU, J., YANG, X., CHEN, H. AND WANG, Y., Eggshell membrane microcolumn solid-phase extraction and determination of trace gold in geological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Atomic Spectroscopy**, v.32, n.5, p.175-181, 2011.

(36) ZOU, X. AND HUANG, Y., Solid-phase extraction based on polyethyleneimine-modified eggshell membrane coupled with FAAS for the selective determination of trace copper (ii) ions in environmental and food samples. **Analytical Methods**, v.5, n.22, p.6486-6493, 2013.

(37) CHEN, M.-L., GU, C.-B., YANG, T., SUN, Y. AND WANG, J.-H., A green sorbent of esterified egg-shell membrane for highly selective uptake of arsenate and speciation of inorganic arsenic. **Talanta**, v.116, p.688-694, 2013.

(38) YANG, T., CHEN, M.-L., HU, X.-W., WANG, Z.-W., WANG, J.-H. AND DASGUPTA, P.K., Thiolated eggshell membranes sorb and speciate inorganic selenium. **Analyst**, v.136, n.1, p.83-89, 2011.

(39) Cheng, X.-z., Liu, J., Zou, S.-f. and Cheng, K. *Monitoring of heavy metal cadmium in environmental water sample by eggshell membrane preconcentration coupled with GF-AAS*. in *Electric Technology and Civil Engineering (ICETCE), 2011 International Conference on*. 2011. IEEE.

(40) Zhang, R.H., Yang, X.L., Liu, J. and Cheng, X.Z. *Eggshell membrane biomaterials for adsorption and determination of Mn (II, VII) in environmental water*. in *Advanced Materials Research*. 2012. Trans Tech Publ.

(41) RAZMI, H., MUSEVI, S.J. AND MOHAMMAD-REZAEI, R., Solid phase extraction of mercury (II) using soluble eggshell membrane protein doped with reduced graphene oxide, and its quantitation by anodic stripping voltammetry. **Microchimica Acta**, v.183, n.2, p.555-562, 2016.

(42) RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I. AND MELO, L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, p.771-780, 2004.

(43) GUIDELINE, I.H.T., Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v.1, 2005.

(44) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N.E.Q.I.-I., Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: documento de caráter orientativo. **Coordenação Geral de Acreditação**, 2011.

(45) FANG, Z., DONG, L. AND XU, S., Critical evaluation of the efficiency and synergistic effects of flow injection techniques for sensitivity enhancement in flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, n.2, p.293-299, 1992.