

## 4 Técnicas empregadas para análise de especiação de antimônio

### 4.1. Importância da análise de especiação

Com intuito de esclarecer e uniformizar o significado apropriado do termo *especiação*, a IUPAC publicou em 2000 o relatório “*Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*” (Templeton *et al.*, 2000). De acordo com este relatório, a utilização do termo “*especiação*” deve se restringir à distribuição de espécies químicas numa determinada amostra ou matriz. Para melhor compreender o real significado de especiação, faz-se necessário definir o que vem a ser uma espécie química. Vários aspectos da estrutura de um composto contribuem para identificar espécies distintas de um determinado elemento, incluindo composição isotópica, estado de oxidação e natureza dos ligantes. Entende-se por espécie química, como a forma específica na qual o elemento se apresenta. Entretanto, alguns autores fazem uso equivocado deste termo (especiação) para indicar a atividade analítica de identificação e quantificação de espécies químicas numa determinada matriz. Segundo o relatório da IUPAC supracitado, dever-se-ia empregar o termo “análise de especiação” exclusivamente ao se referir a este tipo de atividade analítica.

As análises de especiação consistem em aspecto essencial para buscar um maior entendimento sobre o comportamento bioquímico e geoquímico das espécies de elementos-traço em sistemas biológicos e ambientais. Para se obter sucesso em trabalhos de especiação, a metodologia empregada precisa garantir a preservação da integridade das espécies de interesse da amostra durante todos os passos analíticos, ou seja, durante a amostragem, estoque, pré-tratamento e determinação.

Elementos-traço participam ativamente em diversos processos bioquímicos em organismos vivos e no meio ambiente. Consideram-se alguns deles essenciais, e outros tóxicos para o ser humano. Muito pouco se sabe sobre o comportamento bioquímico dos elementos-traço. A toxicidade, biodisponibilidade, transporte e propriedades químicas de um elemento dependem de sua forma química. Espécies químicas distintas de um mesmo elemento químico seguem, em geral, caminhos metabólicos diferentes.

De forma geral, análise de especiação de elementos-traço em fluidos corporais consiste na identificação e, idealmente, quantificação dos compostos biologicamente ativos aos quais o elemento-traço está ligado quimicamente, e na subsequente quantificação do elemento. Primeiro realiza-se a separação e identificação dos componentes, para em seguida poder se determinar a concentração do elemento-traço em cada fração obtida pela separação. Assume-se, desta forma, que existe uma associação entre a biomolécula e o elemento-traço detectado na mesma fração (Cornelis *et al.*, 1993).

Estudos de especiação também têm beneficiado a área de química ambiental, através do desenvolvimento de metodologias para o monitoramento da poluição do meio ambiente por metais. Entretanto, a população mundial ainda não foi beneficiada pelos avanços consideráveis nesta área. Grande parte da legislação ambiental define somente a “concentração máxima permissível (CMP)” de um determinado elemento e não da(s) sua(s) espécie(s) mais tóxica(s). Exceções são o mercúrio e cromo para os quais, em alguns países, as CMPs estabelecidas para as espécies metiladas de Hg e para o Cr(VI), respectivamente.

Um fator limitador, que atrasa os avanços da análise de especiação, é a falta de materiais de referência certificados (MRC). A importância de MRC deve-se ao seu uso em processos de validação metrológica na análise de especiação. Estes materiais devem se assemelhar à composição e concentração da amostra real para qual o método se aplica. Determina-se o valor das concentrações dos elementos por um consenso entre os resultados obtidos por cada um dos laboratórios envolvidos no processo de certificação. Infelizmente, materiais certificados de solo, água do mar, sangue e urina, entre outras matrizes, limitam-se, na grande maioria, à apresentação da concentração total dos elementos. Somente um número muito reduzido apresenta a concentração de alguma(s) espécie(s). No caso específico do antimônio, não existe no mercado um único MRC com espécies certificadas (p.ex., Sb<sup>III</sup>, Sb<sup>V</sup>, espécies metiladas), provavelmente, devido à dificuldade em produzir soluções estáveis e à procura economicamente ainda não atraente. Segundo Cornelis *et al.* (2001), os custos com a produção, certificação e armazenamento podem exceder um milhão de euros por material.

## 4.2.

### **Técnicas analíticas empregadas em análises de especiação de Sb**

A determinação de antimônio em amostras ambientais e biológicas requer um método analítico suficientemente sensível para detectar as suas diferentes espécies, cujas concentrações encontram-se, frequentemente, em níveis de  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou ainda menores (vide item 3.2, página 54, e item 3.3, página 61). Entre os detectores utilizados, destaca-se o espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS), por apresentar alta sensibilidade, inclusive para o antimônio, além de permitir a quantificação pelo método de diluição isotópica (ID-ICPMS), considerada mais exata e precisa. Contudo, devido à alta temperatura do plasma, a técnica de ICPMS limita-se, obviamente, à determinação elementar e isotópica, sem levar em consideração a forma química original da espécie. Por esta razão, métodos de separação e identificação devem ser utilizados, antes da própria quantificação elementar por ICPMS.

As metodologias desenvolvidas para análises de especiação de Sb (e de outros elementos) acoplam uma técnica com alta capacidade de separação das espécies de interesse à outra de detecção com alta sensibilidade. Diversos métodos “hifenados” têm sido propostos na literatura para análise de especiação de antimônio (Tabela 12).

Para a quantificação das espécies inorgânicas de antimônio empregava-se, tradicionalmente, técnica de geração de hidreto, cujo princípio consiste na redução química do Sb(III) em solução aquosa para formar um hidreto volátil e estável. Esta técnica, quando acoplada ao ICPMS, apresenta uma alta sensibilidade por permitir uma eficiência de transporte do analito ao plasma de praticamente 100%. Outras vantagens, proporcionadas pela geração de hidreto, estão relacionadas com a possibilidade de pré-concentração do analito (p.ex., em armadilha criogênica) e a remoção de possíveis interferências provenientes de componentes constituintes da matriz. A determinação do Sb(V) se dá de forma indireta. Devido a baixa taxa de geração do hidreto, faz-se necessária a utilização de um agente pré-redutor. A determinação indireta pode prejudicar a precisão e exatidão dos resultados, quando as duas espécies estão presentes em concentrações muito diferentes. Ademais, a eficiência de geração da estibina pode ser influenciada pela espécie envolvida e pela matriz em que ela se encontra.

**Tabela 12:** Metodologias para análise de especiação de antimônio.

<b>Técnica</b>	<b>Espécies detectadas</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
IC-HG-AFS	Sb (III) e Sb (V), TMSbCl <sub>2</sub>	água fortificada	Hernández-Córdoba <i>et al.</i> , 2006
IC-HG-AFS	Sb (III), Sb (V) e TMSbCl <sub>2</sub>	Sedimento marinho	Pannier <i>et al.</i> , 2005
IC-HG-AFS	Sb (III), Sb (V), TMSbCl <sub>2</sub>	água fortificada	López-Sánchez <i>et al.</i> , 2004
IC-HG-AFS	Sb (III), Sb (V), TMSbBr <sub>2</sub>	água fortificada	Sayago <i>et al.</i> , 2002
IC-HG-AAS	Sb (III) e Sb (V)	tecido animal fortificado	Peña <i>et al.</i> , 2001
HG-IC-AAS	Sb (V) e TMSbCl <sub>2</sub> Sb (III) e Sb (V)	água fortificada	Emons e Krachler, 2000
HG-ICP OES	Sb (III) e Sb (V)	água fortificada	Narasaki <i>et al.</i> , 1999
IC-ID- ICPMS	Sb (III) e Sb (V)	sedimento	Amereih <i>et al.</i> , 2005
IC-ICPMS	Sb (III) e Sb (V)	Urina	Miekeley <i>et al.</i> , 2002
IC-ICPMS	Sb (III), Sb (V) e TMSbCl <sub>2</sub>	água fortificada	Emons e Krachler, 2001a
IC-ICPMS	Sb (III), Sb (V) e TMSbCl <sub>2</sub>	Urina	Emons e Krachler, 2001b
IC-ICPMS	Sb (III) e Sb (V)	material particulado aéreo	Zheng <i>et al.</i> , 2001
IC-ICPMS	Sb (III) e Sb (V)	Extrato de células de <i>L. donovani</i>	Ulrich <i>et al.</i> , 2000
IC-ICPMS	Sb (III), Sb (V), TMSbO	Água fortificada	Ulrich <i>et al.</i> , 1998
IC-ICPMS	Sb (III), Sb (V), TMSb(V)	sedimento de solo	Lintschinger <i>et al.</i> , 1998- b
CE-ICPMS	Sb (III), Sb (V), TMSb(V)	lama de esgoto	Michalke e Schramel, 1999

Legenda: IC = cromatografia iônica; DI = diluição isotópica; HG = geração de hidreto; CE = eletroforese capilar; AFS = espectrometria de fluorescência atômica; AAS = espectrometria de absorção atômica; ICP OES = espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; ICPMS = espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

A escolha da cromatografia iônica como método preferencial de separação para espécies de antimônio foi motivada, principalmente, por dois aspectos: o poder de separação da técnica, permitindo a separação simultânea de diversas espécies presentes

em matrizes complexas; e o comportamento químico das espécies de Sb em solução aquosa, que apresentam cargas distintas neste meio. Contudo, esta técnica apresenta algumas restrições quanto ao seu desempenho analítico. Tipicamente, o Sb(V) apresenta uma fraca interação com resinas de troca aniônica, o que potencialmente acarreta que sua eluição seja muito próxima ao volume morto. Ademais, espécies com caráter iônico similares não podem ser separadas simultaneamente. O desempenho das colunas de troca aniônica para separação de espécies orgânicas é problemático, pois tais espécies encontram-se presentes em soluções aquosas, possivelmente, na forma catiônica ou neutra. Contorna-se parcialmente esta dificuldade através da aplicação de eluição com gradiente de concentração ou com variação abrupta de concentração (*step elution*, isto é, eluição em etapas), ou ainda com alternância de eluentes distintos durante a separação cromatográfica.

Recentemente, a eletroforese capilar (CE) vem ganhando importância em estudos de especiação, devido a sua alta eficiência de separação e a sua habilidade em separar simultaneamente ânions, cátions e espécies neutras. O pequeno volume de amostra utilizado na eletroforese capilar representa uma vantagem para análise de amostras biológicas ou ambientais, quando não há disponibilidade de maior volume. Por outro lado, a técnica requer um detector com maior sensibilidade possível, por causa, justamente, do volume muito pequeno de amostra utilizada (na ordem de nL). Tradicionalmente, em equipamentos comerciais de eletroforese capilar empregam-se detectores de UV-vis, que apresentam baixa sensibilidade. O principal desafio analítico da utilização da eletroforese capilar em análise de especiação é o seu adequado acoplamento com o(s) detectore(s) utilizadas (p.ex., ICPMS e/ou ES-MS). O acoplamento ao ICPMS tem que ser estabelecido através de uma interface que apresente um pequeno volume morto, pois caso contrário, a capacidade de resolução entre as diferentes espécies é prejudicada, e que também, supere a discrepância entre as vazões típicas de cada técnica, da ordem de 0,1 a 1 mL min<sup>-1</sup> para ICPMS com sistema de introdução de amostra convencional, e de <0,05 mL min<sup>-1</sup> para eletroforese capilar (Gervásio *et al.*, 2003; Assis, 2006).

Hifenação das técnicas de separação supracitadas com a ICPMS permite aproveitar as vantagens individuais de cada técnica, assim como, de compensar as suas respectivas limitações. A seguir, será apresentada uma pequena revisão sobre os métodos mais promissores na análise de especiação de antimônio. Adicionalmente, a separação de espécies após geração de hidreto será também comentada.

#### 4.2.1. Métodos cromatográficos

De forma geral, um sistema cromatográfico contém duas fases distintas, a estacionária e a móvel. A fase estacionária, como o próprio nome indica, é uma fase fixa em uma coluna ou superfície plana. A fase móvel se movimenta através da fase estacionária transportando o analito. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária. Esta retenção seletiva resulta em migrações diferenciais das espécies presentes na amostra. A separação dos diversos componentes de uma mistura ocorre em função de uma maior ou menor afinidade de cada um deles pela fase estacionária.

Os métodos cromatográficos são subdivididos em três grupos de acordo com a natureza da fase móvel: líquida, gasosa ou de fluido supercrítico. A seleção por um determinado tipo de cromatografia é feita com base na natureza da amostra e nos recursos disponíveis no laboratório. Considera-se a cromatografia líquida (CL) como um método ideal para separação de espécies iônicas, macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como, uma imensa variedade de outros componentes de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica. Na cromatografia líquida, a única exigência para a amostra é que ela seja solúvel na fase móvel.

A cromatografia líquida de alta eficiência/desempenho (CLAE, HPLC) é uma variante da CL, caracterizada por uma melhor separação das espécies através do uso de colunas de maior comprimento (e menor diâmetro interno), necessitando pressões elevadas na operação, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão. Por isso, as colunas precisam ser mecanicamente mais resistentes (invólucro de aço inox ou plástico). A CLAE pode ser dividida em subgrupos de acordo com a natureza da fase móvel e o mecanismo de separação cromatográfica. No presente trabalho, abordaremos somente a cromatografia líquida de troca iônica, ideal para a separação de espécies iônicas ou de substâncias facilmente ionizáveis.

No caso da cromatografia iônica, o principal processo químico, como o próprio nome sugere, é o de troca iônica. Na fase estacionária deste tipo de cromatografia líquida existem grupos funcionais ionizáveis. Estes grupos retêm espécies (os chamados contra íons) de sinal contrário.

Na Tabela 13 encontra-se a definição de alguns dos principais termos cromatográficos utilizados no presente trabalho. As nomenclaturas e siglas apresentadas seguem as recomendações propostas por Fritz e Gjerde (2000).

**Tabela 13:** Alguns termos utilizados em métodos cromatográficos.

Termo	Sigla	Definição
tempo de retenção	tr	Tempo necessário para eluição da espécie química na sua máxima concentração
tempo morto	t <sub>0</sub>	Tempo necessário para eluir um elemento que idealmente não tenha nenhuma afinidade pela fase estacionária
tempo de retenção ajustado	tr'	tr' = tr - t <sub>0</sub>
fator de retenção	k	K = (tr-t <sub>0</sub> )/t <sub>0</sub>

#### 4.2.1.1.

#### Aplicações da técnica de cromatografia iônica na análise de especiação de antimônio

Em soluções aquosas, o Sb(V) ocorre sob a forma de um ânion com carga -1, [Sb(OH)<sub>6</sub>]<sup>-</sup>. Já o tartarato de Sb(III) também se apresenta como ânion, porém com carga -2, [Sb<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>. Embora não haja consenso sobre a estrutura molecular da espécie trimetilada, acredita-se que ela esteja presente em soluções aquosas na forma catiônica, [TMSbOH]<sup>+</sup>. Devido a esse comportamento químico dos compostos de Sb em solução aquosa, a cromatografia iônica é o método preferencial para estudos de especiação desse elemento.

Diferentes procedimentos para análise de especiação de antimônio em amostras ambientais (águas, sedimentos, material particulado aéreo, biota) e biomédicas (p.ex., urina e plasma) têm sido publicados. Entretanto, o número de procedimentos é ainda relativamente pequeno, além de serem pouco diferenciados (Tabela 14).

A determinação da espécie orgânica (TMSb) e inorgânicas (Sb-III e Sb-V) de antimônio em amostra de material particulado atmosférico foi conduzida por IC-ICPMS, quando se detectou pela primeira vez a espécie orgânica trimetilada de antimônio em amostra dessa natureza (Zheng *et al.*, 2000b). No procedimento analítico foi utilizado a coluna de troca aniônica PRP-X100 e o eluente TMAH (hidróxido de tetrametilamônio) em concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup>. Obteve-se sucesso na separação das espécies TMSb e Sb(V), entretanto, não houve eluição do Sb(III).

**Tabela 14:** Metodologias utilizadas na análise de especiação de antimônio por cromatografia aniônica.

Coluna	Eluente	Tipo de eluição	Técnica	Referência
PRP-X100 (150 mm, Hamilton, EUA)	EDTA-KHP (20 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 4,5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mmol L <sup>-1</sup> ) pH 8,3	gradiente	IC-HG-AFS (a)	Pannier <i>et al.</i> , 2005
PRP-X100 (250 mm, Hamilton, EUA)	Tartarato de amônio (250 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 5,5 KOH (20 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 12	step	IC-HG-AFS (a)	López-Sánchez <i>et al.</i> , 2004
PRP-X100 (150 mm, Hamilton, EUA)	KOH (20 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 11 Tartarato de amônio (200 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 5,0	gradiente	IC-HG-AFS (a)	Sayago <i>et al.</i> , 2002
Dionex AS 14 (Dionex Corp, EUA)	EDTA (1,5 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 4,7	normal	IC-HG-AAS (b)	Emons e Krachler, 2000
ION-120 (Cetac Tech., EUA)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (2 mmol L <sup>-1</sup> ), ác. tartárico (1 mmol L <sup>-1</sup> ) pH 8,5	normal	IC-HG-AAS (c)	Emons e Krachler, 2000
PRP-X100 (150 mm, Hamilton, EUA)	EDTA (2 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 4,7	normal	IC-ICPMS (b)	Miekeley <i>et al.</i> , 2002
PRP-X100 (250 mm, Hamilton, EUA)	EDTA (10 mmol L <sup>-1</sup> ) + Ác. Ftálico (1 mmol L <sup>-1</sup> ) pH 4,5	normal	IC-ICPMS (b)	Zheng <i>et al.</i> , 2001b
PRP-X100 (150 mm, Hamilton, EUA)	HNO <sub>3</sub> (15 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 4,6	normal	IC-ICPMS (b)	Ulrich <i>et al.</i> , 2000
PRP-X100 (150 mm, Hamilton, EUA)	EDTA (20 mmol L <sup>-1</sup> ), KHP (2 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 4,5	normal	IC-ICPMS (b)	Lintschinger <i>et al.</i> , 1998-b

KHP = ftalato monoácido de potássio; (a) separação das espécies: Sb(III), Sb(V) e TMSb; (b) Sb(III) e Sb(V); (c) Sb(V) e TMSb

Aplicou-se o método de cromatografia iônica para análise de extratos celulares de *Leishmania donovani* encubados com Sb(III) como tartarato, e Sb(V) como glucanato. Realizou-se a separação por meio da coluna de troca aniônica PRP-X100 e o eluente ácido nítrico 15 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6. Os tempos de retenção para Sb(III) e Sb(V) foram de 85 s e 300 s, com limites de detecção, em ICPMS, de 0,06 µg L<sup>-1</sup> e 0,29 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Ulrich *et al.*, 2000).

A literatura relata a influência da matriz da amostra na determinação de espécies de antimônio por cromatografia com coluna aniônica acoplada a ICPMS. Lintschinger e colaboradores (1998) compararam o desempenho das colunas de troca aniônica IonPac AS4A-SC (Dionex, EUA) e PRP-X100 (Hamilton, EUA) para a separação cromatográfica de Sb(V) e TMSbCl<sub>2</sub>. Com as duas colunas observou-se um alargamento do sinal de Sb(V) em função do aumento da concentração de NaCl, porém este efeito foi mais pronunciado na coluna da Dionex. A formato do pico de TMSbCl<sub>2</sub> não sofreu alteração em todas as concentrações de NaCl testadas (0,05% a 1% m/v), e em ambas as metodologias. A coluna PRP-X100 apresentou um melhor desempenho, pois tolerou concentrações de NaCl de 0,1 a 0,5% (Lintschinger *et al.*, 1998b). A mudança do comportamento cromatográfico de Sb(V) deve-se, provavelmente, ao grau de saturação da coluna por íons cloreto. Emons e Krachler (2001b) compararam os cromatogramas de solução aquosa de Sb(III) e Sb(V) com urina fortificada contendo as mesmas espécies. Os autores utilizaram a coluna IonPac AS14 (Dionex, EUA) e o eluente EDTA 1,25 m mol<sup>-1</sup> em pH 4,7. No cromatograma de urina ocorreu deslocamento do tempo de retenção e alargamento dos picos das duas espécies em comparação com o cromatograma de solução aquosa, assim como, o aparecimento de sinais não identificados. Sendo assim, recomendam a maior diluição possível de amostras de urina, na utilização desta técnica.

Há outras dificuldades associadas com a especiação de antimônio. O rendimento de extração de compostos de antimônio a partir de amostras sólidas é muito baixo. Apenas uma pequena fração do conteúdo total de antimônio foi extraída de amostra de solo altamente poluído (Lintschinger *et al.*, 1998a). Conseqüentemente, se muitas espécies de Sb ficam retidas na amostra original, abre-se espaço para uma série de especulações sobre o perfil da especiação de antimônio em amostras ambientais. Em outras pesquisas, apesar de ocorrer a separação e detecção de espécies distintas de Sb, algumas delas não puderam ser identificadas. Tal impossibilidade deve-se à falta completa de materiais de referência certificados para Sb e de suas espécies, disponíveis no mercado. Há alguns compostos de Sb inorgânicos, tanto no estado de oxidação + 3 como no + 5, disponíveis comercialmente. Porém, o mesmo não ocorre com compostos orgânicos. Mais recentemente, foi disponibilizado o composto o trimetilantimônio pela firma Sigma-Aldrich (produto no. 557102-15). A síntese de compostos mono e dimetilados de antimônio não foi possível até a presente data, ora porque estes compostos tendem a polimerizar durante a dissolução, ora porque eles não conseguem

ser sintetizados como monômeros (Zheng *et al.*, 2000a). Outro problema refere-se à falta de estabilidade dos compostos de Sb durante todo o processo analítico, desde a amostragem até a detecção. Alguns estudos revelaram que a espécie Sb(III) é facilmente oxidada a Sb(V). Cabe então o questionamento se a predominância da espécie Sb(V) sob a Sb(III), determinada em diversas matrizes, foi superestimada devido à oxidação de Sb(III) durante alguma etapa do processo analítico (Emons e Krachler, 2001b).

#### **4.2.2. Eletroforese Capilar**

A eletroforese capilar consiste na separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo elétrico. Tavares (1996) define a eletroforese como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas constituintes do soro sanguíneo, para o qual recebeu, em 1948, o prêmio Nobel em Química (Daintith, 2000). Entretanto, os efeitos de difusão e de convecção, gerados pela passagem de corrente (efeito Joule), comprometiam a separação dos compostos e limitavam a aplicação da metodologia desenvolvida.

Na década de 1990, ocorreu o avanço mais promissor na metodologia com a utilização de técnicas capilares. A eletroforese capilar, como o próprio nome indica, utiliza capilares extremamente finos de sílica fundida, com diâmetro interno na faixa de 25 a 75  $\mu\text{m}$  (Wehr *et al.*, 1998). A principal vantagem de a eletroforese ocorrer em capilares é a redução dos efeitos de aquecimento que tradicionalmente limitaram as metodologias eletroforéticas. Se não ocorresse a dissipação do calor, o aumento da temperatura poderia levar ao alargamento da banda eletroforética ou ao comprometimento da integridade da amostra. A geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica. A remoção do calor possibilita o estabelecimento de gradientes de campo elétrico de grande magnitude que asseguram uma mais eficiente e mais rápida separação (Majidi, 2000; Jager e Tavares, 2001). Tipicamente, os equipamentos de eletroforese capilar operam com voltagem de 5 a 30 kV, o que resulta em um campo elétrico de até de 300 V/cm. Os tempos de separação alcançados na eletroforese são dependentes das diferenças de potencial aplicadas e do comprimento dos capilares, além das características físico-químicas de cada espécie. Potenciais mais

altos e capilares de menor comprimento proporcionam, obviamente, tempos de análise mais curtos.

Na técnica de eletroforese capilar, separam-se os compostos de uma amostra com base na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão entre carga e raio hidratado e a fatores estruturais. A mobilidade iônica é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional ao raio iônico (hidratado, complexado). Íons menores migram mais rápido que íons maiores de mesma carga. Quando os íons apresentam o mesmo tamanho, o de maior carga migra mais rápido que o íon de menor carga (Silva Jr, 2001). A mobilidade iônica também está relacionada com a mobilidade da vazão eletroosmótica (EOF). Esta vazão causa a movimentação de toda a massa líquida contida no interior do capilar. Assim, a taxa de migração das espécies da amostra depende não só da sua velocidade iônica como também da velocidade do EOF. A velocidade aparente dos ânions é igual à diferença entre a velocidade do EOF e a sua velocidade. Por outro lado, a velocidade aparente de cátions é igual ao somatório das velocidades do EOF e da velocidade do cátion (Kannamkumarath *et al.*, 2002).

Um sistema básico de eletroforese consiste de dois reservatórios que contêm uma solução tampão idêntica e que são conectados entre si por meio de um tubo capilar de sílica fundida, preenchido com a mesma solução tampão, a qual é denominada de eletrólito. Dentro dos reservatórios, há eletrodos de platina conectados a uma fonte de alta tensão, para estabelecer uma diferença de potencial entre as duas extremidades do capilar. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar, geralmente através de uma pressão externa aplicada. O estabelecimento de um campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção aos eletrodos. Como já foi mencionado anteriormente, as separações em eletroforese dependem da vazão eletroosmótica, que gera o movimento da solução dentro do capilar, fazendo com que os solutos se desloquem em direção ao detector. Esta vazão pode reduzir significativamente o tempo de análise ou forçar um íon a reverter a sua tendência de migração em direção a um eletrodo, pelo qual está sendo atraído, devido ao sinal de sua carga. Considerando uma solução com espécies catiônicas, aniônicas e neutras, os cátions irão migrar mais rápidos, pois a velocidade iônica do cátion e do EOF têm a mesma direção. As espécies neutras são carregadas na mesma velocidade do EOF, porém não são separadas uma das outras. E os ânions irão migrar mais devagar, pois a velocidade iônica tem a direção do anodo, sendo contrária, então a velocidade do EOF.

A separação eletroforética de espécies iônicas simples que apresentam mobilidades iônicas muito próximas é inviável. Por exemplo, a separação de vários cátions de metais de transição é praticamente impossível devido à semelhança de raio iônico efetivo, que se reflete na similaridade das mobilidades. Neste caso, faz-se necessário o uso de um agente complexante adequado, capaz de modificar a mobilidade de um ou mais cátions presentes na amostra. A incorporação de agentes complexantes no eletrólito promove a formação de um complexo metálico entre o complexante e o cátion, que por apresentar tamanho e cargas diferentes do cátion livre, terá mobilidade distinta. A alteração seletiva da mobilidade dos cátions provoca uma melhor resolução dos sinais. Substâncias tensoativas e solventes orgânicos, tais como metanol e acetonitrila, são também comumente utilizadas na eletroforese capilar. O uso destes aditivos causa mudanças na migração relativa dos cátions, pois eles alteram a sua camada de solvatação e interações iônicas com o eletrólito de corrida e da superfície do capilar (Tavares, 1997; Assis, 2006).

A versatilidade é uma grande vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação. Com a mesma eficiência, uma variedade grande de analitos pode ser separado, sejam elas moléculas simples ou macromoléculas, polares ou não polares, iônicas ou neutras. Entre as principais modalidades da eletroforese, encontram-se: eletroforese de zona livre que é a mais difundida (CZE) ou simplesmente CE; cromatografia eletrocínética micelar (MECC); eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF); eletroforese capilar de gel; isotacoforese; e eletrocromatografia (CEC) (p.ex. Rubim *et al.*, 2000). A escolha do modo de eletroforese capilar a ser utilizado depende da natureza dos constituintes da amostra, pois as diferentes modalidades apresentam mecanismos de separação singulares e seletividades características.

Apesar das diferentes vantagens da CE mencionadas, poucos trabalhos foram encontrados sobre a aplicação da técnica na separação de espécies de antimônio. A CE-ICPMS foi utilizada por Michalke e Schramel (1999) para determinação de Sb(V), Sb(III) e TMSb em sedimentos de esgoto. O método desenvolvido (eletrólito  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,6) apresentou alta eficiência de separação para as três espécies. Em estudo recente (Assis *et al.*, 2008), a técnica de CE-ICPMS foi aperfeiçoada para separação de 5 espécies de arsênio e aplicada num estudo sobre a transformação metabólica da droga Arsenil® em cavalos.

### 4.2.3. Geração de Hidretos

A geração de hidretos (HG) é uma técnica que permite a separação de espécies com propriedades físico-químicas distintas de um mesmo elemento. Sob condições adequadas, cada espécie gera um hidreto volátil correspondente, permitindo a remoção de várias espécies químicas de um mesmo elemento da matriz da amostra. Os hidretos formados podem ser retidos em colunas cromatográficas a baixa temperatura e liberados seletivamente por aquecimento, antes da detecção. A geração de hidretos, quando acoplada ao ICPMS ou ao ICP-OES, possibilita a introdução direta de espécies voláteis no plasma. Esta forma de introdução oferece uma série de vantagens em relação às técnicas convencionais de nebulização de amostras líquidas, entre elas, a alta eficiência de transporte, que pode ser próximo de 100%.

A espécie química Sb(III) sofre redução química em soluções aquosas ácidas pela reação com o agente redutor borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) formando o hidreto  $\text{SbH}_3$  (estibina). Cabe ressaltar que outros elementos também formam hidretos, tais como As, Se, Sn, Ge, Bi e In. Campos e colaboradores (2000) citam ainda Ag, Au, Cu e Zn; entretanto, para este último grupo de elementos a GH, para finalidades analíticas, ainda está sendo pouco explorada. A geração de hidretos é criticamente dependente do estado de oxidação do analito e, em geral, apenas a espécie com menor estado de oxidação forma o hidreto com rendimento significativo, devido à lenta cinética de conversão da espécie pentavalente a espécie trivalente. Por isto, deve-se adicionar um pré-redutor à amostra, de forma que ocorra, por exemplo, a conversão de Sb(V) em Sb(III). Na etapa de pré-redução do Sb(V) utiliza-se, por exemplo, uma solução aquosa de iodeto de potássio (10% v/v) e ácido ascórbico (0,2% v/v) como agente pré-redutor (Burguera *et al.*, 1995). A presença de ácido ascórbico na solução pré-redutora previne a oxidação do iodeto pelo oxigênio atmosférico. Em meios extremamente ácidos, converte-se tanto a espécie Sb(III) como a Sb(V) em  $\text{SbH}_3$ , porém os rendimentos relativos à espécie pentavalente são significativamente menores do que relativos ao Sb(III), na mesma concentração de ambas. O Sb(III) é seletivamente reduzido a  $\text{SbH}_3$  na presença de Sb(V) em meio de ácido cítrico a  $\text{pH} \geq 2$  ou em meio de ácido tartárico a  $\text{pH} \geq 4$  ou ainda em tampão de borato com pH entre 7 e 8 (Cámara *et al.*, 1992). Entretanto, em sistema de batelada é possível realizar a separação cinética das espécies nos diferentes estados de oxidação (integrando o sinal), evitando, assim, a etapa de pré-redução das espécies.

Dessa forma, o emprego de sistemas de injeção em fluxo favorece a especiação de antimônio por geração de hidretos.

Uma limitação da técnica de HG, que não permite utilizar a sua alta sensibilidade em potencial para elementos como Sb e As (e Hg na técnica do vapor frio), está relacionada à contaminação de reagentes, especialmente a oriunda do borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Outro problema associado à utilização deste agente redutor é a instabilidade de suas soluções aquosas, o que obriga o seu respectivo preparo para uso imediato. Baluja-Santos e Gonzalez-Portal (1992) conseguiram um aumento da estabilidade da solução de borohidreto pela alcalinização com hidróxido de potássio ou sódio. Recomendam a filtração da solução ( $0,45 \mu\text{m}$ ) para remover a turvação produzida pelo precipitado de carbonato. A reação entre  $\text{NaBH}_4$  e Sb(III), além de converter os compostos de antimônio a um hidreto volátil, também produz hidrogênio. A introdução de uma quantidade excessiva de hidrogênio no plasma reduz a sua energia e estabilidade. Conseqüentemente, a eficiência de ionização do antimônio (e de outros elementos) é diminuída, ocasionando perda na sensibilidade de detecção.

Espécies orgânicas de antimônio também podem ser convertidas em espécies gasosas por reação de geração de hidretos. A espécie  $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$  é formada pela reação entre o composto orgânico trimetilado de antimônio  $[(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2]$  e  $\text{NaBH}_4$  a pH 7 (Feldmann *et al.*, 1998). Entretanto, há evidências experimentais de que a espécie  $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$  também sofre reações de perda de metila (desmetilação) durante o processo de geração de hidretos, formando, assim, os hidretos  $\text{SbH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{SbH}_2$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$  (Krachler e Emons, 2000).

#### **4.2.4. Detectores elementares para análise de especiação**

Os métodos de detecção mais utilizados na análise de especiação inorgânica são as espectrometrias de emissão óptica (OES) e de massa (MS), ambas com plasma indutivamente acoplado (ICP), e as espectrometrias de absorção atômica e fluorescência atômica (AAS e AFS). Como a técnica de espectrometria de emissão com chama não apresenta, em geral, sensibilidade suficiente para os elementos mais estudados (Se, As), emprega-se quase exclusivamente, um plasma indutivamente acoplado (ICP).

O plasma tipo ICP, utilizando argônio, apresenta energia suficiente para atomizar e ionizar, de forma eficiente, praticamente todos os elementos da tabela periódica. O

plasma é um gás parcialmente ionizado com temperatura tipicamente entre 6.000 e 8.000 °C, no qual a amostra é introduzida na forma líquida, sólida e/ou gasosa. Após os processos de dessolvatação, dissociação, atomização e ionização, obtêm-se íons positivos, predominantemente mono-valentes, dos elementos presentes na amostra. A alta eficiência do ICP como fonte de ionização deve-se às altas temperaturas alcançadas, relativamente longos tempos de residência do analito no plasma, elevada densidade eletrônica a qual proporciona um alto rendimento de ionização e, finalmente, ao ambiente relativamente inerte do argônio, minimizando reações químicas posteriores à ionização (p.ex. formação de óxidos). Por estas razões, o ICP é uma fonte de ionização ideal para análise elementar em espectrometria de massa (ICPMS).

O emprego da técnica de ICPMS é muito vantajoso no caso de especificação elementar, devido não só a sua capacidade multielementar, alta sensibilidade e seletividade, como também a de fornecer informações sobre a composição isotópica. Descrições detalhadas dos princípios da técnica e do instrumental disponível já foram apresentados em diversas dissertações de mestrado e teses de doutorado defendidas no Depto. de Química da PUC-Rio e podem ser também encontradas em livros textos ou excelentes (p.ex., Montaser, 1998; Beauchemin, 2006). Por isso, apenas alguns poucos comentários serão feitos aqui, visando apenas não deixar completamente “em branco” o assunto para os leitores desta tese ainda não familiarizados com a técnica.

Brevemente, um espectrômetro de massa tipo ICPMS possui as seguintes componentes principais: uma fonte de excitação (ICP), a interface e as lentes iônicas, um separador de massa (quadrupolo ou setor(es) magnético ou elétrico/magnético), e um detector (atualmente, o mais usado é o do tipo dos “dínodos discretos”, DDEM). Há diversos sistemas para introdução de amostras no ICP; no caso de amostras líquidas, utiliza-se nebulizadores (pneumáticos concêntricos, tipo *cross-flow*, ultra-sônicos), que convertem a amostra em fino aerossol. Geralmente, esses nebulizadores são operados dentro de uma câmara de nebulização, a qual tem a função de permitir que somente o aerossol mais fino entre no plasma. Tipicamente, nebulizadores produzem um aerossol com gotículas de diâmetro que variam entre 10 a 100 µm. A qualidade do aerossol formado afeta diretamente o desempenho analítico da técnica. O deslocamento da distribuição de gotículas para diâmetros menores (<10 µm), pela remoção das maiores gotículas através da câmara de nebulização, influencia positivamente a sensibilidade, a repetitividade, e os níveis de óxidos formados. Uma alternativa é a injeção direta do

aerossol para dentro do plasma através de um nebulizador posicionado dentro da tocha e com saída próxima à borda inferior do plasma.

Após os processos de dessolvatação, dissociação, atomização e ionização, ocorrendo no plasma, os íons são extraídos para dentro do analisador de massa. Uma parte crítica do instrumento é a interface, que deve amostrar, de forma representativa, os íons gerados no ICP e transferi-los para o espectrômetro de massa, onde serão separados, seqüencialmente, de acordo com as suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e depois detectados/quantificados. O cone de amostragem e o *skimmer* compõem a interface entre o plasma e o espectrômetro. Os íons saem do ambiente de alta temperatura do plasma e pressão atmosférica para um vácuo diferenciado: cerca de 1 a 2 Torr após o cone de amostragem, cerca de  $10^{-4}$  Torr após o *skimmer* e na região da(s) lente(s) iônica(s), e de  $10^{-5}$  Torr na região do separador de massa (p.ex. quadrupolo). Esta diferença de pressão provoca uma aceleração violenta dos íons que entram na interface, os mesmos atingindo velocidades supersônicas. Como resultado, ocorre uma expansão da nuvem iônica o que acarreta numa nova diluição da amostra. A pressão após o *skimmer* é ainda menor, sendo assim, os íons são novamente acelerados em direção às lentes iônicas. No instrumento utilizado neste trabalho (Elan 5000 ou 6000, PerkinElmer-Sciex, EUA), o vácuo é produzidos através de duas bombas mecânicas e duas bombas turbomoleculares. Necessita-se de vácuo não só para transferir os íons gerados no ICP para o espectrômetro de massa, mas também para evitar colisões de íons do analito com o gás residual no caminho da lente iônica, as quais prejudicariam o rendimento de transmissão dos mesmos. Entre a interface e o quadrupolo, encontra-se o sistema de lentes iônicas que tem como objetivo separar os íons de espécies neutras, focalizar e colimar o feixe de íons. O quadrupolo do instrumento é essencialmente um “filtro de massa” que isola íons de uma razão massa/carga ( $m/z$ ) específica e pré-determinada pelos parâmetros eletrônicos (RF, AC, DC) aplicados a ele. A medição da razão  $m/z$  do íon permite a identificação qualitativa do isótopo mensurado, e a magnitude da corrente iônica, após calibração com soluções de concentração conhecidas, possibilita a quantificação do(s) analito(s) presente(s) na amostra.

#### 4.2.5.

#### Interface entre o ICPMS e o sistema cromatográfico de separação

A interface é a linha de transferência que conecta o sistema cromatográfico ao ICPMS. A função da interface é possibilitar um eficiente transporte da amostra para o espectrômetro. Conecta-se diretamente à saída da coluna cromatográfica e o nebulizador do ICPMS por uma tubulação inerte. O diâmetro e comprimento da linha de transferência devem ser tão pequenos quanto possíveis para evitar que o volume morto da interface provoque o alargamento do sinal.

A escolha do nebulizador a ser empregado na interface é crítica para se obter satisfatória sensibilidade na análise. Os nebulizadores mais utilizados são os do tipo pneumático, como nebulizadores concêntricos e micro-concêntricos. A nebulização pneumática convencional apresenta uma eficiência de apenas 1 a 5% de transporte da amostra, e determina, em grande parte, a sensibilidade da técnica. Quanto maior a eficiência de transporte, melhor a sensibilidade e, conseqüentemente, menores limites de detecção são alcançados. Por este motivo, têm sido propostos outros nebulizadores como o ultra-sônico (USN) e o de injeção direta (DIN).

O USN, além de apresentar uma maior eficiência de transporte (10-30%) em comparação com a nebulização pneumática, porque remove grande parte do solvente através do seu sistema de dessolvatação (p.ex., Montaser, 1998; Sutton e Caruso, 1999). Por isso, é uma alternativa interessante quando se precisa melhorar o(s) limite(s) de detecção do(s) analito(s) de interesse.

O DIN, também chamado de alta eficiência (HEN) ou de consumo total de amostra, possibilita uma eficiência de transporte até 100%. Porém, a entrada de uma grande quantidade de solvente no plasma causa a sua instabilidade, resultando em indesejáveis flutuações no sinal analítico, ou mesmo extinção do plasma. Por esta razão, os nebulizadores do tipo DIN são construídos como micronebulizadores de baixa vazão (<100  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). Mesmo assim, a entrada de solvente no plasma é ainda relativamente alta, diminuindo a sua temperatura e conseqüentemente a sua eficiência de ionização. Por esta razão, a utilização do DIN não tem proporcionado uma melhoria tão expressiva nos limites de detecção alcançados, como era de se esperar por apresentar uma eficiência de transporte tão alta (Michalke, 2002).

Outro fator a ser considerado em relação ao desempenho da interface é a compatibilidade entre a vazão da fase móvel da técnica cromatográfica e a do

nebulizador. Enquanto os nebulizadores DIN e HEN operam a vazões de  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  ou menos, os nebulizadores concêntricos operam com vazões de aproximadamente  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Nesse aspecto, a nebulização pneumática com nebulizador tipo Meinhard convencional apresenta grande compatibilidade com instrumentos de CLAE, que operam com vazões na ordem de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , em muitas aplicações. Entretanto, a tendência de minituarização dos diâmetros internos de colunas, na técnica de micro e nano CLAE (HPLC), objetivando melhores resoluções, tem reconquistado, novamente, a importância dos micronebulizadores, incluindo os de injeção direta.

Há outros fatores que devem ser considerados ao se *hifinar* as duas técnicas e que não se relacionam com o desempenho da interface. A composição química do eluente empregado na fase móvel da cromatografia pode provocar variações nos sinais do ICPMS. Por exemplo, quando uma fase móvel com alto teor salino alcança o plasma, pode ocorrer deposição de materiais no orifício do cone de amostragem. Esta obstrução afeta a amostragem dos íons. Alta concentração de sais também pode provocar o entupimento do nebulizador e a contaminação dos cones e lentes. Sendo assim, a natureza química do eluente tem influência em processos relacionados ao transporte, produção de íons no plasma e condução dos íons para o analisador de massa.

Interferências não espectrais em ICPMS podem ser atenuadas diminuindo-se a concentração de sais dissolvidos no eluente. A presença de modificadores orgânicos na fase móvel, tais como metanol e acetonitrila, também altera as características de ionização e estabilidade do plasma. A natureza da matriz da amostra pode provocar interferências espectrais decorrentes da formação de íons poliatômicos. Tais íons contêm dois ou mais átomos provenientes do plasma (Ar) e da amostra, ou ainda de solvente(s) ou da atmosfera circundante. Por exemplo, a formação de íons como  $(\text{Ar}^{40}\text{Cl}^{35})^+$ ,  $(\text{Ar}^{40}\text{Na}^{23})^+$ ,  $(\text{O}^{16}\text{Cl}^{35})^+$  e  $(\text{Ar}^{40}\text{C}^{13})^+$ , interferindo com os analitos  $^{75}\text{As}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{51}\text{V}$  e  $^{53}\text{Cr}$ , respectivamente, é acentuada na análise de amostras biológicas cujas matrizes apresentem, freqüentemente, altas concentrações de NaCl e carbono orgânico dissolvido. Compilações de interferências em ICPMS foram publicadas por Montaser (1998) e outros autores (p.ex., May e Wiedmeyer, 1998).

#### 4.2.6. Análise por diluição isotópica

Embora esta técnica não tenha sido utilizada no presente trabalho, por causa da sua importância na análise de especiação (e em outras aplicações), serão apresentados aqui apenas alguns conceitos básicos. Muitos elementos, tal qual o antimônio, tem múltiplos isótopos estáveis com abundâncias distintas:  $^{121}\text{Sb}$  ( $a = 57,21\%$ ) e  $^{123}\text{Sb}$  ( $a = 42,78\%$ ). A técnica de diluição isotópica (ID) é caracterizada pela adição à amostra de quantidade conhecida de um elemento/composto enriquecido isotopicamente (*spike*), vide p.ex., Heumann (1985) e Taylor (2001). Após o equilíbrio entre a amostra e o *spike* adicionado, a medição das razões isotópicas no início e depois da “diluição isotópica” permite o cálculo da concentração do analito na amostra, segundo a equação:

$$C_{\text{analito}} = M_e K (A_e - B_e R) / W (BR - A),$$

onde:  $C_{\text{analito}}$  é a concentração do analito na amostra original,  $M_e$  é a massa do *spike* do isótopo enriquecido,  $W$  é a massa da amostra,  $K$  é a razão entre a massa atômica natural e a massa atômica do material enriquecido,  $A$  é a abundância natural do isótopo de referência,  $B$  é a abundância natural do isótopo enriquecido na amostra antes do *spiking*,  $A_e$  é a abundância do isótopo de referência na solução enriquecida com o *spike*,  $B_e$  é a abundância do isótopo enriquecido no *spike*, e  $R$  é a razão isotópica final medida entre o isótopo de referência e o isótopo enriquecido (após o equilíbrio).

Para que a concentração do analito da amostra seja mensurada com alta precisão e exatidão, faz-se necessário escolher dois isótopos livres de interferência. O pré-requisito para o sucesso desta metodologia é o equilíbrio entre o material enriquecido adicionado e a amostra, de forma que garanta uma mistura homogênea entre os isótopos naturais e os enriquecidos (p.ex., Heumann, 1998; Sanz-Medel *et al.*, 2003). Uma vez que se atinge este equilíbrio, qualquer perda que ocorra nos passos subsequentes do processo analítico, não afeta os resultados finais, por que a informação analítica é extraída a partir das razões isotópicas elementares e não a partir da quantidade absoluta das espécies sob investigação. A técnica de DI também proporciona a correção de interferências não espectrais e instabilidades do detector (flutuações do sinal), constituindo-se um padrão interno ideal (Beauchemin, 2006). Como todos os isótopos de um mesmo elemento interagem de forma praticamente idêntica, a razão isotópica não é afetada por qualquer processo que ocorra antes da quantificação, a não ser por interferências espectrais e/ou discriminação de massa. Por estas razões, que podem resultar em resultados com melhor

exatidão e precisão possíveis, e com incertezas bem estabelecidas, a de DI-MS (inglês: ID-MS; ID-ICPMS) é um “método primário” de análise.

O emprego da ID é especialmente útil na análise especiação elementar, podendo ser empregado antes ou depois da separação de espécies do analito (Heumann e Schedlbauer, 1999). A adição do material enriquecido isotopicamente (na forma idêntica às espécies em estudo) antes da separação, permite o controle de todas as etapas da metodologia de análise de especiação, pois permite verificar a ocorrência de reações de interconversão de espécies e as recuperações cromatográficas (*species specific ID-ICPMS*). Por tal motivo, tem-se utilizado esta forma de DI para a validação de metodologias, particularmente, quando não há disponibilidade de material de referência certificado para espécies distintas de um mesmo elemento. Quando compostos de estrutura desconhecida de um determinado elemento estão presentes na amostra, opta-se pela adição do material enriquecido isotopicamente após a separação (*species unspecific ID-ICPMS*). Entretanto, esta última forma empregada em metodologias de especiação não oferece todas as vantagens da DI, como por exemplo, a compensação de extrações não quantitativas, tampouco a verificação da integridade da distribuição de espécies.

Amereih e colaboradores (2005) aplicaram o método da diluição isotópica para quantificação de espécies de antimônio com o objetivo de superar os problemas derivados do efeito da matriz de extratos aquosos de sedimentos. A metodologia consistiu na determinação da razão isotópica dos isótopos  $^{121}\text{Sb}$  e  $^{123}\text{Sb}$  após adição à amostra de um composto enriquecido com o isótopo  $^{123}\text{Sb}$ . A aplicação da diluição isotópica proporcionou a compensação das interferências não espectrais e flutuações dos sinais durante a detecção, o que permitiu a obtenção de limites de detecção para as espécies inorgânicas de Sb entre os mais baixos já obtidos em amostras ambientais (20  $\text{ng L}^{-1}$  e 65  $\text{ng L}^{-1}$  para Sb(V) e Sb (III), respectivamente).