

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

Tássia da Silva Seeger

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA POSTERIOR
ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS POR
LC-ICP-MS**

Santa Maria, RS
2019

Tássia da Silva Seeger

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA POSTERIOR
ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS POR LC-ICP-MS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Santa Maria, RS
2019

Seeger, Tássia da Silva

Avaliação das condições de extração para posterior
especiação de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS / Tássia
da Silva Seeger.- 2019.

118 p.; 30 cm

Orientador: Fábio Andrei Duarte

Coorientadores: Erico Marlon de Moraes Flores, Edson
Irineu Müller

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Especiação 2. Estabilidade de espécies de arsênio
3. Métodos de extração 4. LC-ICP-MS I. Duarte, Fábio
Andrei II. Flores, Erico Marlon de Moraes III. Müller,
Edson Irineu IV. Título.

Tássia da Silva Seeger

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA POSTERIOR
ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS POR LC-ICP-MS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

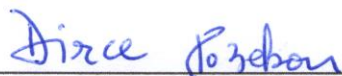
Aprovada em 29 de julho de 2019:




Fábio Andrei Duarte, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Bruno Meira Soares, Dr. (FURG)



Dirce Pozebon, Dra. (UFRGS)



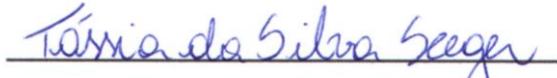
Paola de Azevedo Mello, Dra. (UFSM)



Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)

Declaração

A pesquisa descrita nesta tese foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta tese não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.


Tássia da Silva Seeger

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria, por todas oportunidades de aprendizado oferecidas e por ter sido uma segunda casa ao longo de 12 anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por tornarem possível a execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte, pela orientação, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos ao longo do doutorado.

Aos Prof. Dr. Bruno Meira Soares, Prof^a. Dr^a. Dirce Pozebon, Prof^a. Dr^a. Paola de Azevedo Mello e Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, por fazerem parte da banca examinadora, contribuindo para melhores discussões e aperfeiçoamento do trabalho.

Aos colegas, em especial à Eliana Torres Freitas Larruscain, que contribuiu para execução desse trabalho. Bem como a Ana Caroline Vedovato Rubin, Felipe da Silva Feltrin, Graciela Marini Heidrich, Kéllen Francine Anschau, Michele Stéfani Peters Enders, Morgana Doneda e Vinicius Machado Neves, que ajudaram, participaram e contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus familiares e amigos, pela compreensão, suporte e todo apoio dedicado ao longo de toda minha vida acadêmica.

RESUMO

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA POSTERIOR ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS POR LC-ICP-MS

AUTOR: Tássia da Silva Seeger
ORIENTADOR: Fábio Andrei Duarte

O arsênio é um elemento tóxico, com características carcinogênicas e mutagênicas. Contudo, a toxicidade desse elemento está associada às suas espécies, sendo que algumas delas possuem maior toxicidade que outras. Nesse sentido, a análise de especiação possui relevância para melhor compreensão acerca da disponibilidade de As e seus efeitos em diferentes organismos. As espécies mais comuns de As são as inorgânicas [principalmente As(III) e As(V)] e as orgânicas [derivados metilados, por exemplo dimetilarsênio (DMA) e monometil arsênio (MMA)]. Uma vez que a análise de especiação requer que as espécies sejam preservadas ao longo dos procedimentos envolvidos na sequência analítica, do preparo da amostra à etapa de quantificação, torna-se necessário o cuidado e investigação de fatores que possam influenciar nessa preservação. O preparo de amostra é uma das partes mais críticas nesse procedimento e, por esse motivo, recebe um destaque quando considerados os fatores que podem influenciar na estabilidade das espécies. Em geral, são utilizados métodos de extração para análise de especiação, pois possuem condições mais brandas quanto à temperatura e concentração de reagentes. Esses procedimentos de extração podem ser feitos por extração convencional (com aquecimento condutivo e agitação mecânica), por extração por assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultrassom (UAE), entre outros. Apesar dos dois primeiros serem bem difundidos e utilizados, a aplicação de ultrassom não é tão estudada para a análise de especiação de As, o que gera uma lacuna nos efeitos desse tipo de energia nas espécies de As. Nesse trabalho foi feito um estudo crítico sobre quais fatores que poderiam influenciar na estabilidade das espécies e na eficiência de extração e, quando possível, relacionando ambos fatores. Tendo em vista as diferentes espécies de As encontradas em diferentes tipos de matrizes, foram escolhidas para o desenvolvimento do estudo amostras de alga, arroz e peixe, visando abranger uma quantidade maior de espécies. Alguns parâmetros como tipo e concentração de solução extratora, tempo e temperatura de extração foram avaliados quanto à eficiência de extração, enquanto que a concentração da solução extratora e a adição de íons foi utilizada para a avaliação da estabilidade das espécies. Foi observado que a forma de aplicação de energia utilizada no método de extração não influenciou na estabilidade das espécies nem na eficiência de extração. Por outro lado, foi observado que a temperatura e o tempo de extração influenciaram na eficiência de extração, enquanto que a concentração de HNO_3 como solução extratora, além de influenciar na eficiência de extração, acarretou na conversão da espécie desconhecida de As (UK1) presente na alga. Quanto a adição de íons, foi observada que a adição de Fe^{3+} provocou conversão da espécie UK1 da alga em As(III) e As(V) e a conversão de As(III) e DMA presente no arroz em As(V). Adicionalmente, foram feitas as quantificações das espécies de As presentes nas amostras utilizando a condição mais adequada para a extração das espécies em cada tipo de matriz sem que ocorresse conversão entre as espécies, limite de quantificação do método foi de $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$.

Palavras-chave: Arsênio. Especiação. Estabilidade de espécies. Métodos de extração. Preparo de amostras.

ABSTRACT

EVALUATION OF EXTRACTION CONDITIONS FOR ARSENIC SPECIATION IN FOODS BY LC-ICP-MS

AUTHOR: Tássia da Silva Seeger

ADVISOR: Fábio Andrei Duarte

Arsenic is a toxic element with carcinogenic and mutagenic characteristics. However, its toxicity is associated with their species, because some present different toxicities. In this sense, speciation analysis is mandatory for understanding the availability of As and its effects in different organisms. The most common As species are inorganic [such as As(III) and As(V)] and organic [methylated derivatives, e.g. dimethylarsenic (DMA) and monomethylarsenic (MMA)]. Since speciation analysis requires that the species be preserved throughout the procedures involved in the analytical sequence, from the sample preparation up to the detection, several aspects should be carefully investigated to assure the species preservation. Sample preparation is one of the most critical steps during analysis, mainly taking into account the factors that may influence the species stability. In general, extraction methods are used for speciation analysis, since they show milder conditions regarding to the temperature and reagents concentration. These extraction procedures can be performed by conventional extraction (conductive heating and mechanical stirring), microwave-assisted extraction (MAE), ultrasonic-assisted extraction (UAE), among others. Although conventional extraction and MAE present widespread use, the application of ultrasound have not been well studied for As speciation analysis, which generates a gap in the literature about the effects of this type of energy on As species. In this work, a critical study was carried out evaluating the main factors that could influence the species stability and extraction efficiency. Considering the variety of As species in different types of matrices, samples of algae, rice and fish were chosen for this study, covering a high as possible number of As species. Some parameters such as type and concentration of extraction solution, time and temperature of extraction were evaluated for the extraction efficiency, while the concentration of the extraction solution and the addition of ions was used to evaluate the stability of As species. It was observed that the energy source used in the extraction method did not influence the stability of the species, as well the extraction efficiency. On the other hand, it was observed that the temperature and extraction time influenced the extraction efficiency, whereas the concentration of HNO₃ as extraction solution, influenced the extraction efficiency, resulting in the conversion of the unknown As species (named UK1) present in the algae. After ions addition before extraction, it was observed that the addition of Fe³⁺ in algae provides the conversion of UK1 species into As(III) and As(V) and in rice provides the conversion of As(III) and DMA into As(V). In addition, the quantification of As species in the samples was performed using the optimized extraction conditions for each matrix without species conversion. The limit of quantification of the method was 0.06 µg g⁻¹.

Keywords: Arsenic. Speciation. Species stability. Extraction methods. Samples preparation.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Utilização da UAE para posterior especificação de As..... | 32 |
| Tabela 2 - Programa de irradiação utilizado para MAE. | 45 |
| Tabela 3 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por MAD..... | 46 |
| Tabela 4 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por MIC..... | 46 |
| Tabela 5 - Condições de eluição avaliadas para especificação de As por LC-ICP-MS..... | 48 |
| Tabela 6 - Resultados para determinação de elementos em alga, arroz e peixe por ICP-MS ^a , ICP-OES ^b e ISE ^c . Concentração expressa em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 3). | 57 |
| Tabela 7 - Condições otimizadas para especificação de As por LC-ICP-MS..... | 59 |
| Tabela 8 - Variação do tempo de retenção das espécies de As em função da solução extratora utilizada..... | 80 |
| Tabela 9 - Condições selecionadas para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe..... | 97 |
| Tabela 10 - Quantificação de espécies de As em alga por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e HNO_3 0,01 mol L ⁻¹ como solução extratora. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 2). | 100 |
| Tabela 11 - Eficiência de extração, recuperação cromatográfica e balanço de massa para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe. Valores expressos em %. | 100 |
| Tabela 12 - Quantificação de espécies de As em arroz por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e HNO_3 1,0 mol L ⁻¹ como solução extratora. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 2). | 104 |
| Tabela 13 - Quantificação de espécies de As em peixe por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e H_2O como solução extratora. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 2). | 106 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fluxograma dos experimentos de avaliação da extração e estabilidade de espécies de As em alga, arroz e peixe. | 53 |
| Figura 2 - Perfil cromatográfico obtido por LC-ICP-MS para solução de referência de As(III), As(V), DMA e MMA contendo 5,0 µg L ⁻¹ de cada espécie para coluna de troca aniônica. | 60 |
| Figura 3 - Perfil cromatográfico obtido por LC-ICP-MS para solução de referência de As(III), As(V) e AsB contendo 5,0 µg L ⁻¹ de cada espécie para coluna de troca catiônica. | 61 |
| Figura 4 - Influência das soluções extratoras na eficiência de extração de As total em alga, arroz e peixe utilizando diferentes métodos de extração..... | 63 |
| Figura 5 - Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS para espécies de As extraídas de alga utilizando HNO ₃ e H ₂ O como solução extratora e UAE - <i>cup horn</i> | 66 |
| Figura 6 - Cromatogramas sobrepostos para espécies de As extraídas de alga utilizando H ₂ O, HNO ₃ 0,01, 0,05 e 1,0 mol L ⁻¹ como soluções extratoras e MAE..... | 67 |
| Figura 7 - Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS para espécies de As em arroz utilizando HNO ₃ e H ₂ O como solução extratora e extração convencional. | 69 |
| Figura 8 - Cromatogramas obtidos para LC-ICP-MS para espécies de As extraídas de peixe utilizando HNO ₃ e H ₂ O como soluções extratoras e UAE - banho de ultrassom..... | 71 |
| Figura 9 - Detalhamento do cromatograma obtido por LC-ICP-MS para peixe utilizando o extrato diluído 5 vezes..... | 72 |
| Figura 10 - Influência da H ₂ O e da concentração de HNO ₃ na eficiência de extração de As total em alga, arroz e peixe utilizando diferentes métodos de extração. | 73 |
| Figura 11 - Influência do tempo de extração na eficiência de extração de As total em alga e arroz utilizando diferentes métodos de extração..... | 75 |
| Figura 12 - Influência da temperatura de extração na eficiência de extração de As total em alga e arroz utilizando diferentes métodos de extração..... | 77 |
| Figura 13 - Avaliação da influência da solução extratora (H ₂ O e HNO ₃ 1,0 mol L ⁻¹) na estabilidade das espécies As(III), DMA, MMA, As(V) e AsB em solução e referência (25 µg L ⁻¹ de As para cada espécie)..... | 79 |
| Figura 14 - Cromatogramas obtidos para espécies iAs após procedimento de extração na presença de Cu ²⁺ , Fe ³⁺ e Zn ²⁺ | 83 |
| Figura 15 - Cromatogramas obtidos para espécies DMA, MMA e AsB após procedimento de extração na presença de Fe ³⁺ | 84 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16 - Cromatogramas obtidos na avaliação do efeito da adição de Fe ³⁺ em solução de referência. (A) As(III) sem adição de Fe ³⁺ , extração com HNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹ e submetido ao procedimento de UAE - banho de ultrassom; (B) As(III) com adição de Fe ³⁺ , extração com HNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹ e submetido apenas a aquecimento até 85 °C por 10 min; (C) As(III) com adição de Fe ³⁺ , extração com H ₂ O e submetido ao procedimento de UAE - banho de ultrassom; (D) As(III) com adição de Fe ³⁺ , extração com HNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹ e sem aquecimento; (E) As(III) com adição de Fe ³⁺ , extração com H ₂ O e sem aquecimento..... | 86 |
| Figura 17 - Cromatogramas obtidos para (A) alga, (B) arroz e (C) peixe enriquecidos com 25 µg L ⁻¹ de As(III) após UAE - banho de ultrassom. | 88 |
| Figura 18 - Espécies de As em alga após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 3,2, (B) 8,2 e (C) 16,4 mg L ⁻¹ de Fe ³⁺ no extrato. | 90 |
| Figura 19 - Espécies de As em arroz após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 0,2, (B) 0,5 e (C) 1,0 mg L ⁻¹ de Fe ³⁺ no extrato. | 91 |
| Figura 20 - Espécies de As em peixe após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 0,19, (B) 0,47 e (C) 0,94 mg L ⁻¹ de Fe ³⁺ no extrato. | 92 |
| Figura 21 - Aspecto da superfície da amostra de alga (A) antes e (B) após o procedimento de extração empregando UAE - banho de ultrassom..... | 93 |
| Figura 22 - Aspecto da superfície da amostra de arroz (A) antes e após o procedimento de extração empregando (B) agitação mecânica, (C) banho de ultrassom, (D) <i>cup horn</i> e (E) micro-ondas para extração. | 95 |
| Figura 23 - Aspecto da superfície da amostra de peixe (A) antes e (B) após o procedimento de extração empregando UAE - banho de ultrassom..... | 96 |
| Figura 24 - Curvas de calibração para as espécies de As por LC-ICP-MS utilizando DMA para coluna de troca aniônica e AsB para coluna de troca catiônica..... | 99 |
| Figura 25 - Cromatogramas para espécies de As em alga. (A) Extrato diluído 20 vezes, (B) extrato diluído 2 vezes, (C) detalhamento do cromatograma mostrado em B..... | 102 |
| Figura 26 - Cromatograma para espécies de As em arroz. | 104 |
| Figura 27 - Cromatogramas para espécies de As em peixe. (A) Extrato diluído 100 vezes, (B) extrato diluído 2 vezes, (C) detalhamento do cromatograma mostrado em B..... | 107 |
| Figura 28 - Cromatogramas para ensaio de recuperação nos extratos de (A) alga, (B) arroz e (C) peixe..... | 108 |
| Figura 29 - Fluxograma sobre os parâmetros de extração avaliados e suas influências na eficiência de extração e estabilidade das espécies de As..... | 109 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| AAS | espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>atomic absorption spectrometry</i> |
| ANOVA | análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i> |
| AsB | arsenobetaína |
| AsC | arsenocolina |
| AFS | espectrometria de fluorescência atômica, do inglês <i>atomic fluorescence spectrometry</i> |
| As(III) | arsenito |
| AsLip | arsenolipídeos |
| AsSug | arsenoaçúcar, do inglês <i>arsenosugar</i> |
| As(V) | arsenato |
| CE-ICP-MS | eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| cps | contagens por segundo |
| d.i. | diâmetro interno |
| DMA | Dimetilarsênio |
| GF AAS | espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> |
| GC-ICP-MS | cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| HG AAS | espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i> |
| HG-AFS | espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos, do inglês <i>hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i> |
| HG-CT-AAS | geração de hidretos com trapeamento criogênico e detecção por espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica, do inglês <i>hydride generation cryotrapping atomic absorption spectrometry</i> |
| iAs | espécies inorgânicas de arsênio |
| ICP-MS | espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| ICP-OES | espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> |
| LC | cromatografia a líquido, do inglês <i>liquid chromatography</i> |
| LC-HG-AAS | cromatografia a líquido com geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrometry</i> |

| | |
|----------------|---|
| LC-HG-AFS | cromatografia a líquido com geração de hidretos acoplada à espectrometria de fluorescência atômica, do inglês <i>liquid chromatography hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i> |
| LC-ICP-MS | cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| LC-UV-HG-AFS | cromatografia a líquido com geração de hidretos e radiação de ultravioleta acoplada à espectrometria de fluorescência atômica, do inglês <i>liquid chromatography ultraviolet radiation hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i> |
| LOQ | limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i> |
| MAD | decomposição assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted digestion</i> |
| MAE | extração assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted extraction</i> |
| MIC | combustão iniciada por micro-ondas, do inglês <i>microwave-induced combustion</i> |
| MMA | Monometilarsênio |
| oAs | espécies orgânicas de arsênio |
| PEEK | poli(éter cetona), do inglês <i>poly(ether ketone)</i> |
| PS-DVB | poli(estirenodivinilbenzeno), do inglês <i>poly(styrene-divinylbenzene)</i> |
| RSD | desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> |
| SPE | extração em fase sólida, do inglês <i>solid-phase extraction</i> |
| TMAO | óxido de trimetilarsina |
| t _R | tempo de retenção |
| UAE | extração assistida por ultrassom, do inglês <i>ultrasound-assisted extraction</i> |
| UK | espécie desconhecida, do inglês <i>unknown species</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 23 |
| 2.1 | ARSÊNIO - CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 23 |
| 2.1.1 | Espécies de arsênio..... | 24 |
| 2.2 | PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA EXTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO..... | 26 |
| 2.2.1 | Extração assistida por micro-ondas..... | 28 |
| 2.2.2 | Extração assistida por ultrassom..... | 29 |
| 2.3 | TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO..... | 35 |
| 2.3.1 | Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado..... | 35 |
| 3 | OBJETIVO..... | 37 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 4.1 | INSTRUMENTAÇÃO..... | 39 |
| 4.2 | REAGENTES..... | 40 |
| 4.3 | MATERIAIS DIVERSOS..... | 41 |
| 4.4 | AMOSTRAS E PRÉ-TRATAMENTO..... | 42 |
| 4.5 | SISTEMAS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO..... | 43 |
| 4.6 | PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA PREPARO DE AMOSTRA..... | 44 |
| 4.6.1 | Procedimentos empregados para extração de As por extração convencional, MAE e UAE..... | 44 |
| 4.6.2 | Decomposição assistida por radiação micro-ondas..... | 45 |
| 4.6.3 | Combustão iniciada por micro-ondas..... | 46 |
| 4.7 | OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS..... | 47 |
| 4.8 | OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO..... | 49 |
| 4.8.1 | Avaliação da eficiência da extração de arsênio..... | 49 |
| 4.8.1.1 | <i>Escolha do tipo da solução extratora.....</i> | 49 |
| 4.8.1.2 | <i>Concentração da solução extratora.....</i> | 49 |
| 4.8.1.3 | <i>Tempo de extração.....</i> | 50 |
| 4.8.1.4 | <i>Temperatura de extração.....</i> | 50 |
| 4.8.2 | Avaliação da estabilidade das espécies de arsênio..... | 51 |
| 4.8.2.1 | <i>Avaliação da solução extratora e concentração de HNO₃.....</i> | 51 |
| 4.8.2.2 | <i>Avaliação da presença de íons Cu, Fe e Zn na solução de referência.....</i> | 51 |
| 4.8.2.3 | <i>Adição de Fe³⁺ às amostras.....</i> | 51 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 5.1 | PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 55 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 5.2 | DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS POR MAD E MIC PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR..... | 56 |
| 5.3 | OTIMIZAÇÕES PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS..... | 58 |
| 5.4 | AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL..... | 61 |
| 5.4.1 | Avaliação da solução extratora..... | 62 |
| 5.4.2 | Avaliação da concentração de HNO₃..... | 64 |
| 5.4.2.1 | <i>Avaliação da estabilidade de espécies de As em alga em função da concentração de HNO₃.....</i> | 64 |
| 5.4.2.2 | <i>Avaliação da estabilidade de espécies de As em arroz em função da concentração de HNO₃.....</i> | 68 |
| 5.4.2.3 | <i>Avaliação da estabilidade de espécies de As em peixe em função da concentração de HNO₃.....</i> | 70 |
| 5.4.2.4 | <i>Avaliação da concentração do HNO₃ na eficiência de extração de arsênio total.....</i> | 72 |
| 5.4.3 | Avaliação do tempo de extração..... | 74 |
| 5.4.4 | Avaliação da temperatura de extração..... | 76 |
| 5.5 | ESTUDO DA ESTABILIDADE DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E AMOSTRA..... | 77 |
| 5.5.1 | Solução extratora..... | 77 |
| 5.5.2 | Efeito da adição de íons Cu, Fe e Zn..... | 81 |
| 5.5.2.1 | <i>Adição de íons à solução de referência das espécies de As.....</i> | 81 |
| 5.5.2.2 | <i>Efeito da adição de Fe³⁺ na conversão de As(III) em solução de referência e nas amostras.....</i> | 84 |
| 5.6 | AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 93 |
| 5.7 | QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO..... | 96 |
| 5.7.1 | Condições estabelecidas para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe..... | 96 |
| 5.7.2 | Quantificação das espécies de As em alga, arroz e peixe..... | 98 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 111 |
| | REFERÊNCIAS..... | 113 |

1 INTRODUÇÃO

O As é um elemento considerado tóxico, mesmo em baixas concentrações, sendo necessário seu monitoramento e controle no ambiente, alimentos e bebidas. As regulamentações acerca desse elemento geralmente tratam de sua concentração total, porém seu efeito toxicológico está associado com as propriedades físicas e químicas, mobilidade e biotransformação de suas espécies. Uma vez que a toxicidade do As está relacionada com a sua forma química (espécie), estudos que visam apenas a determinação da concentração total fornecem resultados menos relevantes. Dentre as espécies de As, as inorgânicas apresentam maior toxicidade enquanto compostos orgânicos de As são menos tóxicos.^{1,2} Dessa maneira, estudos que visam a especiação de As são caracterizados como de grande relevância na investigação de efeitos causados por esse elemento.

Em geral, a análise de especiação requer um método de preparo de amostra adequado, o qual deve permitir que as espécies não sofram conversões e que sejam transferidas para uma solução compatível com a técnica de quantificação. Nesse sentido, os métodos que atendem essas premissas e empregam condições mais brandas são comumente utilizados para extração de espécies de As.^{3,4}

A utilização de fontes alternativas de energia vem recebendo grande destaque em diversos ramos da Química e os métodos de preparo de amostra também estão incluídos nesta tendência. Dentre essas fontes, podem ser citadas a utilização de micro-ondas e ultrassom. A radiação micro-ondas possui diversas aplicações para a análise de especiação, não apenas de As, mas também para outros elementos como Hg e Se.^{5,6,7} Por outro lado, apesar de ser utilizado com o propósito de extração de elementos e posterior determinação da concentração total, o ultrassom tem sido pouco aplicado para a especiação de As, quando comparado com aquecimento convencional ou por radiação micro-ondas.^{8,9} Assim, poucos estudos tratam sobre o efeito do ultrassom na conversão de espécies, quando esse tipo de energia é utilizada.

Nesse sentido, o presente trabalho visa realizar um estudo sistemático para avaliação das diferentes formas de fornecimento de energia para extração de espécies de As, combinado à eficiência de extração proporcionada pelas soluções extratoras, além de traçar um paralelo sugerindo condições de compromisso ao avaliar fatores que podem influenciar na conversão das espécies de As.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ARSÊNIO - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O As é um elemento considerado tóxico e contaminações causadas por ele ainda são uma preocupação ambiental, uma vez que a exposição ao As acontece principalmente através da ingestão de água contaminada ou de alimentos acumuladores de As. A exposição humana ao As ocorre pelas formas ocupacionais e ambientais, estando a primeira relacionada à produção ou transformações de diversos produtos e a segunda à fontes como alimentos, água, ar e solo.¹⁰

No caso da contaminação ocupacional, esse elemento ocorre habitualmente em minérios de Au, Pb, Cu e Ni, podendo ser emitido durante processos de mineração ou fundição. Por outro lado, a contaminação de alimentos por As pode ocorrer muitas vezes por pesticidas e fertilizantes empregados nas culturas, pois esses contém elevadas quantidades desse elemento, ou até mesmo pela água de irrigação.^{10,11} Embora os pesticidas a base de compostos de As tenham sido substituídos por outros compostos orgânicos, ainda é possível encontrar esse elemento como contaminante em algumas culturas. Contudo, quando considerados os alimentos, os de origem marinha são responsáveis por cerca de 90% da exposição humana ao As.¹⁰

Quando no organismo humano, o As pode afetar os sistemas neurológico, cardiovascular e respiratório, causando diversos problemas de saúde e com efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Nesse sentido, existem legislações e normativas quanto a quantidade limite de As em água e em diversos alimentos. A legislação brasileira estabelece como limite máximo para bebidas concentrações entre 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, estando o limite relacionado com o tipo de bebida, ou até 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para outros alimentos,¹² enquanto para água potável o máximo permitido é 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.¹³ Adicionalmente, também existem limites para alimentos específicos quanto a concentração máxima de As, como arroz e derivados (0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$), peixe (1 $\mu\text{g g}^{-1}$), moluscos (1 $\mu\text{g g}^{-1}$), cogumelos (0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$), legumes (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$), entre outros.¹⁴

Tendo em vista a variedade de espécies de As e, conseqüentemente, as diferenças entre as propriedades dos seus compostos de origem natural e antropogênica, a química do As no ambiente (água, solo ou sedimento) é bastante complexa. No entanto, sabe-se que a acumulação do As em diferentes organismos

vivos está relacionada com o fato de suas propriedades químicas serem similares às do N e P, dois elementos que possuem grande participação nas rotas metabólicas dos seres vivos. Dessa forma, pode ocorrer a substituição desses elementos por As durante os processos metabólicos. Além disso, o As pode se comportar de forma similar ao P, contudo em função de seu maior caráter metálico, possui menor tendência à formação de ligações covalentes, coexistindo como contaminante em depósitos de fosfatos.¹¹

Ainda, é importante mencionar que o As não é um elemento essencial para processos biológicos. Devido a não ter uma rota metabólica definida no organismo humano, o As inorgânico tende a ser acumulado nos tecidos, devido a sua afinidade com proteínas e lipídios. Tem-se o conhecimento que o As é carcinógeno para seres humanos, estando a sua inalação ou ingestão associada a cânceres de pulmão, pele e fígado.²

2.1.1 Espécies de arsênio

Conforme descrito anteriormente, o As pode ser encontrado em diferentes formas químicas, dependendo do meio em que estiver inserido, sendo que sua toxicidade estará relacionada à forma química. De maneira geral, as espécies orgânicas de As (oAs) possuem menor toxicidade do que as espécies inorgânicas de As (iAs), sendo que as de menor número de oxidação são mais tóxicas. Por exemplo, as espécies inorgânicas arsenato [As(V)] e arsenito [As(III)], possuem maior toxicidade, quando comparadas às espécies orgânicas como os derivados metilados. Ou seja, espécies como dimetilarsênio (DMA), monometil arsênio (MMA) e óxido de trimetilarsina (TMAO), possuem menor toxicidade. Cabe mencionar que a espécie arsenobetaina (AsB), não é considerada tóxica e é metabolizada pelo organismo humano, enquanto que a toxicidade de espécies de arsenoaçúcares (AsSug) e arsenolipídios (AsLip) não está totalmente elucidada, embora existam relatos de que também podem ser metabolizadas pelo organismo humano.^{1,15}

As espécies inorgânicas de As são encontradas principalmente como As(III) e As(V), sendo que ambas as espécies podem ser encontradas simultaneamente, com proporção dependente do potencial redox do meio.¹¹ Devido a essa coexistência das espécies iAs e o equilíbrio existente entre elas, muitas vezes a concentração de ambas é tratada como um somatório de As(III) e As(V), sendo expresso como iAs.¹⁶

Em ambientes aquáticos, a espécie majoritária é o As(V), mas também podem ser encontrados As(III), DMA e MMA. Nesses ambientes, a concentração de As total é tipicamente menor que $10 \mu\text{g L}^{-1}$, porém devido à bioacumulação, a concentração desse elemento em organismos marinhos, pode ser significativamente maior. Assim como outros elementos tóxicos, o As pode ser facilmente bioacumulado em alguns sistemas marinhos ou em plantas por diferentes vias tróficas, sendo que quanto mais alto for o nível na cadeia alimentar, maior será a quantidade de As acumulada.¹⁰

Para que ocorra a bioacumulação, as espécies iAs são convertidas em espécies oAs pelos organismos marinhos. Por esse motivo, a concentração de espécies orgânicas, como DMA e MMA, são relativamente maiores em frutos do mar, enquanto que espécies como AsSug tem sido identificadas principalmente em algas marinhas e em animais que se alimentam de algas.^{16,17} Contudo, a AsB é a espécie de As mais abundante em animais marinhos. Desse modo, é possível inferir que a alimentação humana baseada no consumo de alimentos como algas e peixes bioacumuladores de As é uma das formas mais comuns de ingestão de As.¹⁵

Uma vez que cada estado de oxidação/espécie de As possui diferentes características toxicológicas, a análise de especiação desse elemento fornece informações mais detalhadas sobre quais são as espécies que os seres humanos estão expostos, bem como os riscos associados. Por exemplo, no caso de alimentos, a diferenciação entre a concentração de espécies iAs e oAs é importante uma vez que em alguns derivados de peixe, o limite estabelecido pela legislação é ultrapassado. Contudo, o As pode estar presente na forma de AsB, uma espécie considerada não tóxica.²

O estudo de especiação do As, além de fornecer informações acerca de formas tóxicas deste elemento, pode contribuir ainda com dados que corroborem com estudos a respeito do ciclo biogeoquímico marinho do As, da posição trófica de espécies marinhas em função das formas químicas acumuladas nos tecidos das mesmas, capacidade inerente de biotransformação e outras peculiaridades referentes ao metabolismo desse elemento e suas formas. Diversos estudos relacionados à especiação de As buscam elucidar quais as transformações que ocorrem com essas espécies, conforme o meio ou organismo em estudo.¹⁶

Dessa maneira, como a biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos e toxicológicos do As dependem de sua forma química, a especiação e as

transformações as quais esse elemento está sujeito no ambiente assumem grande importância. Para a análise de especiação são empregados diversos métodos, que tornam possível a pesquisa quanto à disponibilidade e concentração das espécies em diversos tipos de amostra. Ainda assim, o desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitem a separação das espécies da matriz e sua posterior determinação estão em constante desenvolvimento.^{18,19}

2.2 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA EXTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO

A análise de especiação possui diversas particularidades quando considerados os procedimentos analíticos empregados, uma vez que devem ser considerados fatores que podem acarretar risco de conversão de espécies, devido ao uso de alguns reagentes ou aquecimento, perda de espécies voláteis ou formação de espécies originalmente não encontradas na matriz, entre outros. Logo, após a definição das espécies a serem estudadas e da escolha da técnica de quantificação, que atenda às necessidades da análise, como concentração e seletividade as espécies, geralmente é necessária a escolha de um método de preparo de amostra adequado.²⁰

No caso da quantificação de espécies de As, esse preparo prévio da amostra também é requerido, sendo que o método utilizado para a eliminação e/ou separação da matriz deve garantir que as espécies sejam preservadas para a posterior quantificação. Por esse motivo, os métodos de extração são bastante empregados e adequados para essa finalidade, quando comparados com métodos mais agressivos, como os métodos de decomposição. Os métodos de extração visam a transferência das espécies de uma fase para outra. No caso de amostras sólidas, através da dessorção, difusão ou solvatação, as espécies devem migrar para uma fase líquida (ou sólida) adequada para a técnica de quantificação.^{3,21} Dentre as alternativas para extração, quando utilizada uma fase sólida para a migração de espécies de As, pode ser citada a utilização da extração em fase sólida (SPE).^{22,23}

Muitos são os métodos de extração descritos na literatura, onde são empregadas diferentes soluções extratoras, fontes de aquecimento, procedimentos como as diferentes formas na execução da extração, bem como meios de agitação,

para uma diversidade de matrizes. Quanto às soluções extratoras, cabe destacar que o tipo de solvente é bastante dependente das características da matriz, como a quantidade de gordura ou composição inorgânica, sendo que a maioria das espécies de As, em sua forma solúvel, podem ser extraídas simplesmente com H₂O. Além dela, misturas de H₂O e metanol em diferentes proporções e soluções ácidas, como HNO₃ e H₃PO₄, são comumente empregadas.^{4,8,24}

Algumas vezes, a complexidade da matriz ou a interação dos compostos de As com os constituintes dessa acarretam em uma menor eficiência da extração das espécies de As presentes. Esses aspectos estão relacionados diretamente com a eficiência do método de extração, assim como fatores como temperatura e tempo de extração. Tanto a eficiência de extração do elemento, quanto a recuperação cromatográfica, podem ser calculadas em função da concentração total, obtida através de um método de decomposição completa da matriz e posterior determinação da concentração total do elemento. No caso da especiação, o conhecimento da concentração total é necessário também, pois deve ser relacionado ao somatório das espécies após a separação e quantificação.²⁰ As equações a seguir descrevem como podem ser calculadas a eficiência de extração e recuperação cromatográfica, ambas em porcentagem.

$$\text{Recuperação cromatográfica} = \frac{\sum \text{concentração de cada espécie}}{\text{concentração total no extrato}} \times 100$$

$$\text{Eficiência de extração} = \frac{\text{concentração total no extrato}}{\text{concentração total no digerido}} \times 100$$

Em geral, as extrações sólido-líquido com agitação mecânica ou magnética apresentam boa eficiência, contudo outros métodos de extração, como a extração assistida por micro-ondas (MAE) e a extração assistida por ultrassom (UAE) são propostos como alternativa para possibilitar condições menos morosas. Esses tipos de energia podem ser utilizados para extração, tanto para a quantificação da concentração de elementos, quanto para a especiação. Nesse sentido, a seguir estarão descritas as principais características das aplicações relatadas na literatura para os principais procedimentos utilizados para extração de espécies de As.

2.2.1 Extração assistida por micro-ondas

A radiação micro-ondas é uma radiação que faz parte do espectro eletromagnético, compreendendo a faixa de frequência que varia de 300 MHz a 300 GHz, sendo a frequência de 2450 MHz empregada para a fabricação de fornos de uso doméstico, científico ou industrial. As micro-ondas são radiações não ionizantes e, em função da sua baixa energia, não causam mudanças na estrutura molecular da matéria pela ação da onda, tampouco tem energia suficiente para causar quebra de ligações químicas.^{20,21}

Assim como as demais radiações eletromagnéticas, as micro-ondas podem ser descritas em termos de campo elétrico e magnético, estando o aquecimento relacionado com a orientação espacial das moléculas e íons em função do campo elétrico. O aquecimento utilizando micro-ondas se dá devido ao alinhamento dos polos das moléculas (rotação de dipolo) ou movimentação dos íons (condução iônica) em função do campo elétrico aplicado. Como ocorre a oscilação do campo elétrico na frequência da radiação, as moléculas e íons alteram novamente sua orientação constantemente, logo ocorre a dissipação da energia na forma de calor na solução devido à resistência do meio a essa movimentação das moléculas e íons. Em função desse mecanismo de aquecimento, onde a absorção de energia ocorre diretamente pelo material que está sendo irradiado, pode-se considerar que o aquecimento é mais homogêneo em relação ao aquecimento em sistemas por convecção.^{20,21}

A radiação micro-ondas pode ser utilizada de diferentes maneiras, sendo que os sistemas disponíveis comercialmente possuem diversas configurações, desde os tipos de frascos que podem ser utilizados até a forma como a radiação é aplicada. No caso do emprego da MAE, devem ser tomados os mesmos cuidados que citados anteriormente quando à estabilidade e conversão das espécies. Adicionalmente, a escolha das soluções extratoras é dependente da sua interação com a radiação micro-ondas, devido aos fenômenos de condução iônica e rotação de dipolos.^{20,21}

Em função das suas características, a radiação micro-ondas é amplamente utilizada para a extração de espécies de As, onde diferentes instrumentos estão disponíveis. Geralmente, fatores como temperatura, potência de irradiação aplicada e tempo de exposição à radiação podem ser avaliados e otimizados para uma melhor eficiência da MAE. A maioria dos procedimentos empregados consiste na

pesagem da amostra para o frasco do equipamento de micro-ondas, adição de solução extratora e posterior irradiação. Em alguns casos, ao final da extração, os extratos precisam passar por uma etapa de *clean-up* previamente à determinação. A MAE apresenta algumas vantagens como eficiência, reprodutibilidade, tempo reduzido de extração e segurança, sendo os dois primeiros fatores bastante críticos para a análise de especificação.^{20,21}

2.2.2 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom representa as ondas sonoras que possuem frequências maiores que 20 kHz, estando compreendidas acima do limite da audição humana. Essa onda mecânica se propaga em meios materiais, em ciclos consecutivos de compressão e rarefação, sendo necessário que o meio possua propriedades elásticas. A geração das ondas ultrassônicas é feita por dispositivos chamados transdutores eletromecânicos baseados no efeito piezoelétrico inverso, onde energia elétrica é convertida em energia mecânica, graças a ciclos de expansão e contração de um cristal piezoelétrico.^{25,26,27}

Relacionado com as aplicações na área da Química, o ultrassom desperta interesse nas pesquisas pois as ondas interagem com bolhas presentes no líquido. A cavitação acústica é caracterizada pela formação, crescimento e implosão de bolhas de gases e vapores, sendo que a implosão gera condições de temperatura e pressão pontuais elevadas, além de proporcionar colisões em alta velocidade entre partículas. Essas características acabam por possibilitar uma gama de aplicações, em função das suas consequências, como geração de espécies radicalares, microjatos, emissão sonoluminescente de luz, turbulência, entre outros. Adicionalmente, os microjatos gerados no colapso da bolha de cavitação, quando em contato com a superfície sólida, causam erosão e fragmentação dessa superfície, auxiliando nos processos de transferência de massa e a melhora na eficiência de extração.^{25,26,28}

O emprego do ultrassom no preparo de amostras ou extração de elementos de diferentes tipos de matrizes tem sido reportado por diferentes autores, com diversas aplicações para esse tipo de energia.²⁹ Dentre as vantagens a serem citadas no emprego do ultrassom, merecem destaque as diferentes formas de aplicação da energia, onde podem ser utilizados sistemas como banho de ultrassom,

sonda ou *cup horn*, o maior fornecimento de energia ao sistema, utilização de elevada massa de amostra, utilização de H₂O ou reagentes diluídos como soluções extratoras, e uso de sistemas que operam em condições de pressão ambiente e temperaturas moderadas (entre 25 e 100 °C). Adicionalmente, essa energia é considerada ambientalmente limpa.²⁰

Quando considerada a UAE, cabe destacar que os fenômenos relacionados à cavitação podem contribuir para uma melhor eficiência de extração, uma vez que as condições geradas podem acarretar uma maior interação entre a fase líquida e a sólida pela geração de microjatos, maior turbulência do meio e até mesmo uma maior homogeneidade. Tendo isso em vista, a aplicação desse tipo de energia é viável para a extração de elementos visando sua quantificação, bem como para a análise de especiação.

A UAE tem sido utilizada em alguns trabalhos para especiação de As, como mostrado na Tabela 1. Nesses trabalhos, geralmente foram analisadas amostras biológicas ou geológicas, com massa de amostra entre 0,075 e 1 g. As soluções extratoras utilizadas comumente (H₃PO₄, HNO₃ e H₂O) são as mesmas que quando utilizados outros métodos de extração, como MAE ou aquecimento convencional. Ainda sobre os trabalhos referidos na Tabela 1, é importante ressaltar que muitos deles não abordam ou avaliam fatores como amplitude, frequência e potência dos sistemas de ultrassom utilizados. Logo, cabe destacar que a maior variação da UAE decorre da forma como a energia é aplicada, uma vez que são utilizados diferentes aparatos, como banho de ultrassom e sonda, diferentes faixas de potência e de amplitude, tempo de extração e procedimentos empregados, sendo que em alguns casos é até mesmo feita a combinação com a MAE.³

Em contrapartida, apesar desses estudos mostrarem aplicações satisfatórias da UAE para posterior especiação de As, poucos deles relatam a possível conversão das espécies nos meios de extração, bem como quais fatores poderiam causar este efeito. Nesse sentido, apesar da viabilidade da UAE para especiação de As, algumas investigações cuidadosas se fazem necessárias para entender como esse tipo de energia pode influenciar na estabilidade e conversão de algumas espécies. Uma vez que a cavitação e os microambientes de alta pressão e temperatura gerados podem promover a formação de espécies intermediárias altamente reativas, podendo ser gerado um ambiente favorável para a conversão das espécies.²⁸

Adicionalmente, o efeito da presença de outros elementos também merece atenção, uma vez que, frente à ação do ultrassom e o ambiente gerado em função da propagação desse tipo de energia, as condições redox do meio podem ser alteradas, influenciando na preservação das espécies de As, gerando conversões indesejadas. Dessa maneira, é essencial que sejam feitos estudos sistemáticos sobre o emprego da UAE visando compreender a influência do ultrassom e como as alterações do meio podem acarretar alterações das espécies de As.

Tabela 1 - Utilização da UAE para posterior especificação de As.

(continua)

| Amostra | Espécies | Condições de extração | Condições do ultrassom | Técnica de determinação | Referência |
|-----------------------------|--------------------------------|--|--|-------------------------|------------|
| Sedimento de rio | As(III), As(V), DMA e MMA | 1 g de amostra + 10 mL de H ₂ O destilada ou tampão fosfato | Sonda (100 W, 20 kHz, 30%) por 1 min | LC-HG-AFS | 30 |
| Vegetais | As(III), As(V), DMA e MMA | 1 g de amostra + 10 mL de H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ e Triton XT-114 0,1% (m/v) | Banho por (50 W, 50 Hz) 10 min | HG-AFS | 31 |
| Cogumelo | As(III) e As(V) | 1 g de amostra + 10 mL de H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ com Triton X-100 0,1% (v/v) | Sonda (50 W, 50 kHz) por 10 min | HG-AFS | 32 |
| Alho | As(III) e As(V) | 0,1 g de amostra + 10 mL de H ₂ SO ₄ 1,0 mol L ⁻¹ | Sonda (600 W, 40 kHz) por 10 min | GF AAS | 33 |
| Frango, arroz, peixe e solo | As(III), As(V), DMA, MMA e AsB | Frango: 0,15 g de amostra + 15 mg de protease + 3 mL de H ₂ O Arroz: 0,3 g de amostra + 3 mL de H ₂ O + 10 mg de α-amilase + 30 mg de protease Peixe: 0,1 g de amostra + 5 mL de H ₂ O Solo: 0,1 g + 10 mL de H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ | Sonda (30%) por 4 min para frango, 3 min para arroz, 1 min para peixe e 1 min (2 etapas de 30 s) para solo | LC-ICP-MS | 34 |
| Tecido de frango | As(III), As(V), DMA, MMA e AsB | 0,2 g de amostra + 10 mL de metanol:H ₂ O 1:1 (v/v) | Radiação micro-ondas (100 W) por 4 min e posterior Sonda (50 W) por 3 min | LC-UV-HG-AFS | 35 |

Tabela 1 - Utilização da UAE para posterior especificação de As.

(continuação)

| Amostra | Espécies | Condições de extração | Condições do ultrassom | Técnica de determinação | Referência |
|--------------------------------------|--------------------------------|---|--|-------------------------|------------|
| Solo | As(III), As(V), DMA e MMA | 0,2 g de amostra + 25 mL de ácido pentético 5 mmol L ⁻¹ | Sonda (20 kHz, 20%) por 10 min | LC-HG-AAS | 36 |
| Arroz e cereais | As(III), As(V), DMA e MMA | 1 g de amostra + 10 mL de H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ e Triton XT-114 0,1% (m/v) | Sonda (50 W, 50 Hz) por 10 min | HG-AFS | 37 |
| Trigo e produtos derivados | As(III), As(V), DMA e MMA | Procedimento A: 0,35 g de amostra + 5 mL de metanol:H ₂ O 1% (v/v) Procedimento B: 0,35 g de amostra + 10 mL de H ₂ O água | Procedimento A: Banho (50 °C) por 2 h, procedimento repetido 5 vezes e mais uma etapa <i>overnight</i> sob agitação e sonicação Procedimento B: Sonda (90 - 95 °C), procedimento repetido 3 vezes | LC-ICP-MS | 38 |
| Arroz, arroz com casca, palha e solo | As(III), As(V), DMA, MMA e AsB | Arroz e casca de arroz: (etapa 1) 0,3 g de amostra + 10 mg de α-amilase + 3 mL de H ₂ O (etapa 2) + 30 mg de protease Palha: (etapa 1) 0,1 g de amostra + 10 mg de α-amilase + 3 mL de H ₂ O (etapa 2) + 30 mg de protease Solo: 0,1 g + 5 mL de H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ | Arroz, casca de arroz e palha: sonda (30%) por 1 min (etapa 1) e sonicação por 2 min (etapa 2) Solo: Sonda (30%) por 30 s | LC-ICP-MS | 39 |
| Arroz | As(III), As(V), DMA e MMA | 0,3 g de amostra + 10 mg de α-amilase + 3 mL de H ₂ O (etapa 1) e 30 mg de protease (etapa 2) | Sonda (30%, 25 °C) por 1 min (etapa 1) e por 2 min (etapa 2) | LC-ICP-MS | 40 |

Tabela 1 - Utilização da UAE para posterior especiação de As.

(conclusão)

| Amostra | Espécies | Condições de extração | Condições do ultrassom | Técnica de determinação | Referência |
|--------------------------|-------------------------------------|--|---|-------------------------|------------|
| Rocha | As(III) | 1 g de amostra + 10 mL de H ₂ O | Sonda (20 kHz, 200 W cm ⁻²) por 5 min. O procedimento foi repetido com o resíduo 17 vezes | HG AAS | 41 |
| Cabelo | As(III), As(V), DMA e MMA | 0,075 g de amostra + 3 mL de CH ₂ O ₃ ou enzimas lipase e protease em meio aquoso | Sonda (30%) por 5 min | LC-ICP-MS | 42 |
| Frutos do mar | As(III), As(V), DMA, MMA, AsB e AsC | 0,25 g de amostra + 7,5 mL de solução aquosa (pH = 3) contendo 75 mg de pepsina | Banho (35 kHz, 40 °C) por 5 min | LC-ICP-MS | 43 |
| Fertilizantes fosfatados | As(III) | 0,1 g de amostra + 10 mL de HNO ₃ 6,5 mol L ⁻¹ + 10 mL de Triton X-114 0,35% (m/v) | Banho (40 kHz) por 35 min | HG AAS | 44 |
| Alimento infantil | As(III), As(V), DMA e MMA | 0,25 - 0,5 g de amostra + 5 mL de HCl 3 mol L ⁻¹ | Banho (35 kHz) em 2 etapas de 15 min cada | HG-CT-AAS | 45 |
| Arroz e peixe | As(III), As(V), DMA, MMA e AsB | 1 g de amostra + 10 mL metanol:H ₂ O 1:1 (v/v) | Banho por 20 min, procedimento repetido 3 vezes | LC-ICP-MS | 46 |
| Cogumelo | As(III), As(V), DMA, MMA e AsB | 0,2 g de mostra + 5 mL de H ₂ O | Banho (60 °C) por 30 min | LC-ICP-MS | 47 |
| Cogumelo | As(III), As(V), DMA, MMA, AsB e AsC | 2 g de amostra + 30 mL de CH ₃ COOH 0,3 mol L ⁻¹ | Banho (300 W, 60 °C) por 10 min, procedimento repetido 2 vezes | LC-ICP-MS | 48 |

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para a quantificação total de elementos, uma vez que conhecer a concentração de elementos tóxicos ou essenciais presentes em alimentos, fármacos, materiais, entre outros, é uma informação relevante em diversas áreas. Por outro lado, a análise de especiação também é importante nesse contexto, pois fatores como toxicidade, mobilidade química, biodisponibilidade e bioacumulação estão relacionados com as espécies químicas.² Logo, são necessárias técnicas que possibilitem a separação e quantificação das espécies com exatidão e precisão aceitáveis. Ademais, no caso do As, outro ponto fundamental da análise de especiação envolve a identificação de espécies de As pouco conhecidas como, por exemplo, espécies de AsSug e AsLip.⁴⁹

Nesse sentido, diferentes técnicas são empregadas para a especiação de As, sendo que algumas delas possibilitam apenas a quantificação de espécies conhecidas, com base em soluções de referência contendo tais espécies. Para isso, podem ser utilizadas técnicas não-cromatográficas, como espectrometria de fluorescência atômica (AFS)^{50,51} e espectrometria de absorção atômica (AAS),⁵² ou técnicas cromatográficas, como cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (GC-ICP-MS)⁵³ e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (CE-ICP-MS).⁵⁴ Ainda, dentre as técnicas cromatográficas, a mais utilizada e descrita na literatura para a especiação de As é a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS).^{18,55} A seguir serão discutidos os principais aspectos dessa técnica comumente utilizada para a análise de especiação de As, bem como suas vantagens e desvantagens.

2.3.1 Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A análise de especiação requer que a instrumentação analítica proporcione alta sensibilidade, bem como boa seletividade. Como muitas das técnicas propiciam a detecção em baixas concentrações, porém de forma não seletiva, a utilização de técnicas hífenadas, onde a instrumentação permite o acoplamento de uma técnica

de separação ao instrumento de detecção, como a LC-ICP-MS, a identificação e quantificação de diversas espécies acaba sendo possível.⁴⁹

A LC é bastante versátil para a separação de espécies de As, pois possibilita a utilização de diferentes mecanismos de separação, como fase reversa, pareamento iônico ou troca iônica, neste último podendo ser utilizados tanto mecanismo de troca catiônica, quanto aniônica.⁵⁵ Além disso, o acoplamento entre a coluna cromatográfica e o sistema de introdução de amostra do equipamento de ICP-MS, comumente a nebulização pneumática, é bastante simples. A saída da coluna pode ser conectada diretamente ao nebulizador para a formação do aerossol, sendo necessário apenas o ajuste adequado entre as vazões da bomba de administração da fase móvel e do gás de nebulização do espectrômetro, para possibilitar a formação adequada do aerossol para introdução no plasma.^{18,49}

A LC-ICP-MS é empregada para a separação e quantificação de espécies de As em diferentes matrizes, desde água até organismos marinhos. Como vantagens, além do acoplamento simples entre a técnica de separação e detecção, podem ser citados os baixos limites de quantificação (LOQ) alcançados (da ordem de ng g^{-1}), instrumentação comercialmente disponível e amplamente aplicada para esse tipo de análise, tempos de separação cromatográfica geralmente inferiores a 20 min, possibilidade de eluição isocrática, entre outras. Em contrapartida, como desvantagem, pode ser citada a dificuldade de identificar espécies desconhecidas, uma vez que são necessárias soluções de referência para conhecer o tempo de retenção (t_R) das espécies. Como exemplo, podem ser citadas espécies como AsSug e AsLip para as quais não há soluções de referência disponíveis comercialmente. Adicionalmente, quando utilizada a LC-ICP-MS, em virtude de a fonte de ionização ser bastante energética e, na maioria das aplicações, o espectrômetro de massa ser de baixa resolução, a identificação de espécies desconhecidas fica inviável.^{18,49}

3 OBJETIVO

Esse trabalho tem como objetivo geral avaliar quais condições de extração são adequadas para diferentes tipos de matriz, com garantia de estabilidade das espécies de As durante o preparo de amostra.

Como objetivos específicos, podem ser destacados:

- Comparar as diferentes fontes de energia utilizadas para aquecimento nos procedimentos de extração.
- Traçar um paralelo sugerindo condições de compromisso ao avaliar fatores que podem influenciar na conversão das espécies de As.
- Avaliar a viabilidade da UAE para especiação de As e como esse tipo de energia pode influenciar na estabilidade e conversão de algumas espécies.
- Avaliar o efeito da presença de outros elementos (concomitantes) na estabilidade das espécies de As.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, serão descritos os equipamentos, reagentes e materiais utilizados para os experimentos desenvolvidos para esse trabalho. Cabe destacar que, no período em que foram feitos os experimentos, ocorreram pausas para manutenção necessária nos instrumentos de ICP-MS, necessitando o uso de dois equipamentos distintos. Para o melhor entendimento, principalmente nos casos de acoplamento entre as técnicas de LC e ICP-MS, no decorrer da discussão dos experimentos será informado qual equipamento foi utilizado. Adicionalmente, em alguns casos, as condições de separação cromatográfica, sobretudo a concentração da fase móvel e tempo de separação cromatográfica otimizados, foram alteradas em virtude da perda de eficiência de separação das colunas de troca aniônica utilizadas, estando essas modificações descritas ao longo da discussão dos experimentos.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A quantificação dos elementos para a caracterização das amostras foi feita pela técnica de ICP-MS. Para tanto, foram utilizados dois instrumentos de ICP-MS, modelos NexION 300X e ELAN DRC II (PerkinElmer), os quais serão denominados ao longo do texto como NexION e ELAN. Os isótopos monitorados foram: ^{109}Ag , ^{75}As , ^{137}Ba , ^{209}Bi , ^{79}Br , ^{112}Cd , ^{35}Cl , ^{59}Co , ^{53}Cr , ^{65}Cu , ^{127}I , ^{55}Mn , ^{95}Mo , ^{62}Ni , ^{208}Pb , ^{123}Sb , ^{82}Se , ^{120}Sn , ^{51}V e ^{66}Zn . Ambos equipamentos estavam equipados com nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização ciclônica, tocha e tubo injetor de quartzo com 2 mm d.i. (PerkinElmer). A potência do gerador de radiofrequência 1300 W e a vazão do gás auxiliar foi 1,2 L min⁻¹. A vazão do gás principal foi de 18 e 15 L min⁻¹ para os equipamentos NexION e ELAN, respectivamente. A vazão do gás de nebulização sempre foi ajustada quando necessário em função das condições de operação do equipamento, variando entre 0,94 e 1,18 L min⁻¹ para ambos os equipamentos.

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Optima 4300 DV, PerkinElmer) também foi utilizado para a quantificação. Os seguintes elementos, e seus respectivos comprimentos de onda, foram monitorados: Al 396,153 nm, Ca 422,673 nm, Fe 239,262 nm, K 766,490 nm, Mg 285,213 nm, Na 589,592 nm, P 213,617 nm, S 181,975 nm e Sr 421,552 nm. O equipamento foi

operado com vista axial, equipado com um nebulizador do tipo GemCone® acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica (PerkinElmer). As vazões dos gases principal, auxiliar e de nebulização foram de 15, 0,2 e 0,70 L min⁻¹, respectivamente, com potência do gerador de radiofrequência em 1400 W.

As espécies de As foram separadas e quantificadas mediante o acoplamento LC-ICP-MS. Quando utilizado o equipamento NexION, foi utilizado um sistema composto por uma bomba quaternária para LC e um degaseificador a vácuo (modelo Flexar LC Pump, PerkinElmer). Para o equipamento ELAN, a separação das espécies de As foi feita através de um sistema também composto por uma bomba quaternária para LC (modelo Series 200 LC Pump, PerkinElmer) e um degaseificador à vácuo (modelo Series 200 Vacuum Degasser, PerkinElmer). Ambos sistemas foram equipados com uma válvula injetora Rheodyne e uma alça de amostragem de poli(éter éter cetona) (PEEK) com capacidade de 200 µL.

Para a separação de espécies foram utilizadas colunas (Hamilton) de troca aniônica PRP-X100 (250 x 4,1 mm, 10 µm de diâmetro de partícula) e de troca catiônica PRP-X200 (150 x 4,1 mm, 10 µm de diâmetro de partícula). O material da coluna de troca aniônica é composto por poli(estireno-divinilbenzeno) (PS-DVB) com grupos funcionais trimetilamônio, enquanto que o material da coluna de troca catiônica é composto por PS-DVB com grupos funcionais ácido sulfônico. A injeção das soluções de referência e amostras foi feita com uma seringa de vidro (Hamilton, EUA) com capacidade para 1,25 mL. A saída da coluna cromatográfica foi acoplada diretamente ao nebulizador do equipamento de ICP-MS.

4.2 REAGENTES

Todas soluções e reagentes foram preparados mediante diluição ou dissolução em água ultrapura, obtida através de destilação, deionização em coluna de troca iônica e osmose reversa em sistema Milli-Q (Millipore), com resistividade final de 18,2 MΩ cm. O HNO₃ (65% m/m, Merck) utilizado para preparo das soluções extratoras, decomposição das amostras e preparo de soluções de referência foi purificado em sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR 2.01E, Milestone).

Para o preparo das curvas de calibração foi utilizada uma solução multielementar (SCP33MS, PlasmaCAL), soluções monoelementares de F, Cl, Br e I (preparadas a partir da dissolução dos respectivos sais de sódio, Merck) e soluções

das espécies de As(III) (NaAsO_2 , Merck), As(V) ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), DMA ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsO}_2\text{Na}$, Sigma Aldrich), MMA (CH_5AsO_3 , doado pelo Prof. Dr. Jörg Feldmann da University of Aberdeen, Aberdeen, Escócia) e AsB ($\text{C}_3\text{H}_6\text{AsCH}_2\text{COOH}$, doado pelo Prof. Dr. Walter Goessler da University of Graz, Graz, Áustria).

Além de HNO_3 e água, também foram avaliados como soluções extratoras H_3PO_4 (85% m/m, Merck) na concentração $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e metanol (99% m/m, Merck), na proporção metanol: H_2O 1:1 (v/v). As fases móveis avaliadas foram preparadas pela dissolução dos sais de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Vetec) e NH_4CO_3 (Sigma-Aldrich) em água ultrapura, enquanto que a piridina (Merck) foi diluída em água ultrapura. O ajuste do pH foi feito com soluções na concentração de 50% (v/v) de HNO_3 ou NH_4OH (28 - 30% v/v, Merck).

4.3 MATERIAIS DIVERSOS

As amostras foram pesadas em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Para a filtração dos extratos foram utilizadas seringas de polipropileno pulverizadas com polietileno, com volume de 5 mL (B. Braun Melsungen AG) e filtros de nylon (N66) com poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel). Todos os extratos foram centrifugados previamente à etapa de filtração utilizando uma centrífuga (modelo Q222T208, Quimis Aparelhos Científicos LTDA). O aquecimento das amostras em banho-maria foi feito com o auxílio de uma chapa de aquecimento (modelo Are heating magnetic stirrer, VELP Scientifica). O monitoramento da temperatura dos extratos e do banho-maria foi feito com o auxílio de um termômetro digital (modelo AK05, AKSO Produtos Eletrônicos).

O ajuste do pH das fases móveis foi feito utilizando um potenciômetro digital (modelo 781 pH/Ion Meter, Metrohm) equipado com um eletrodo combinado de pH para meio aquoso (modelo 6.0262.100, Metrohm). A determinação de F foi feita utilizando o mesmo potenciômetro, porém equipado com um eletrodo íon seletivo para fluoreto (modelo 6.502.150, Metrohm). Nas determinações feitas por ICP-OES e ICP-MS foi utilizado Ar com 99,998% de pureza (Air Liquide), como gás do plasma, auxiliar e de nebulização.

4.4 AMOSTRAS E PRÉ-TRATAMENTO

As amostras de arroz integral (longo fino, tipo 1) e de peixe (espécie cação, nome popular dado ao tubarão para fins comerciais) utilizados nesse trabalho foram adquiridas no comércio da cidade de Santa Maria - RS. A amostra de alga Nori (desidratada) para sushi (originada da China) foi adquirida em uma loja virtual especializada em alimentos orientais.

A moagem do arroz foi feita utilizando um moinho de bolas (modelo PM 200, Retsch GmbH Hann) equipado com frascos recobertos com ZrO_2 , com volume interno de 50 mL e esferas de ZrO_2 de 20 mm. A amostra de peixe foi cortada com o auxílio de uma faca de aço inoxidável e liofilizada (liofilizador modelo LH 2000/3, Terroni Equipamentos LTDA) por um período de 7 dias, necessário para perda da umidade da amostra, a uma temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A amostra de alga foi adquirida desidratada, sendo as folhas cortadas manualmente em pedaços menores. As amostras de alga e peixe foram moídas em moinho criogênico (Freezer Mill modelo 6750, Spex CertPrep), resfriado com Ar líquido. O programa de moagem para esse procedimento foi de 3 min de congelamento e 3 min de moagem.

Após a moagem, as amostras foram peneiradas em um tamisador eletromagnético (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA) equipado com peneiras com aberturas de 45 a 840 μm para separação de acordo com o tamanho de partícula. As peneiras foram encaixadas nas hastes do equipamento e a quantidade total de cada amostra foi colocada na peneira superior. A agitação foi mantida por 20 min e, posteriormente, a quantidade de amostra final em cada peneira foi coletada e pesada.

Adicionalmente, após a etapa de moagem, as amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Sigma 300 VP, Carl Zeiss) com filamento de emissão por campo do tipo Schotky (filamento de tungstênio recoberto com óxido de zircônio), equipado com coluna Gemini (Carl Zeiss). Para obtenção das imagens da superfície das amostras foi utilizado o detector de elétrons secundários no modo de alto vácuo. Após os procedimentos de extração, o material sólido que decantou na etapa de separação do sobrenadante foram separados e secos para também serem caracterizados por MEV, a fim de observar eventuais alterações na estrutura das partículas das amostras em função das diferentes formas de extração.

4.5 SISTEMAS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO

Os experimentos envolvendo UAE foram feitos empregando dois sistemas de ultrassom. Foram utilizados *i*) um banho de ultrassom (modelo TI-H-10, Transsonic, Elma GmbH&Co) com controle de temperatura e potência efetiva de 200 W, frequência de 35 ou 130 kHz e volume de 8,6 L e *ii*) um *cup horn* (Sonics and Materials Inc.) com 165 mm de altura, 85 mm de diâmetro externo, 76 mm de diâmetro interno, acoplado ao gerador de 20 kHz e 750 W, com cuba de vidro. A temperatura no sistema *cup horn* foi controlada com um banho termostático (modelo MTC 110 Plus, Servylab Equipamentos e Móveis para Laboratórios LTDA) com circulação de água, com controle de temperatura entre -3 a 110 °C. A sonda utilizada para o sistema *cup horn* foi resfriada pela passagem de ar comprimido durante os experimentos para evitar superaquecimento do sistema. Para avaliação dos efeitos da agitação no meio, proporcionados pelo ultrassom, também foi avaliado um sistema de agitação mecânica para extração convencional. Para isso, foi utilizada uma incubadora (modelo TE-420, Tecnal Equipamentos Científicos), operando a uma velocidade de 250 rpm e temperatura de 55 °C (temperatura máxima de operação do sistema).

Todas as extrações empregando extração convencional (empregando aquecimento condutivo e agitação mecânica) e UAE tiveram a temperatura monitorada com termômetro digital. Essas extrações foram feitas em frascos de polipropileno com fundo cônico com volume de 50 mL (Sarstedt AG & Co), sendo as amostras pesadas diretamente nos frascos. Para extração convencional, os frascos foram fixados na incubadora com ajuda de suportes adaptados na própria incubadora, enquanto para a UAE, os frascos foram posicionados com o auxílio de suporte universal e garras, sendo os frascos alocados sempre na mesma posição e altura.

Para a extração por MAE, foi utilizado o sistema Multiwave Pro (Anton Paar) equipado com 4 frascos de quartzo com 80 mL de capacidade, com temperatura e pressão máximas de 250 °C e 80 bar, respectivamente. Para esses experimentos a amostra foi pesada diretamente dentro dos frascos de quartzo.

4.6 PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA PREPARO DE AMOSTRA

4.6.1 Procedimentos empregados para extração de As por extração convencional, MAE e UAE

Para as extrações utilizando extração convencional (empregando aquecimento condutivo e agitação mecânica) e UAE as amostras foram pesadas diretamente nos frascos de polipropileno, seguido da adição de 10 mL da solução extratora. Previamente a extração, esses frascos foram submetidos ao aquecimento em banho-maria até atingir a temperatura desejada para a extração. A seguir, os frascos foram transferidos para os sistemas de banho de ultrassom, *cup horn* ou incubadora. Após o tempo de extração, os frascos foram retirados dos sistemas e avolumados a 25 mL com água.

Para a MAE, as amostras foram pesadas diretamente nos frascos de quartzo e após a adição de 10 mL da solução extratora, os mesmos foram fechados e submetidos ao programa de irradiação (Tabela 2) no forno de micro-ondas. É importante salientar que no caso da MAE, além do tempo de extração, foi necessário um tempo inicial de 2 min e 30 s para que a temperatura (indicada pelo sensor do forno de micro-ondas), 75 ou 85 °C, fosse atingida em todos os frascos. Nesse sentido, o tempo total de irradiação foi $2,5 + t$ min, onde t é o tempo de extração avaliado ou otimizado para cada uma das amostras. Ao final do programa e resfriamento do sistema, os extratos foram coletados e avolumados a 25 mL com água. Os frascos utilizados para MAE foram descontaminados com HNO₃ concentrado previamente à realização de nova extração, sendo aplicado o programa de irradiação por 10 min a 1000 W e 20 min a 0 W (resfriamento). Após a descontaminação, os frascos foram lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Tabela 2 - Programa de irradiação utilizado para MAE.

| Etapa | Potência (W) | Tempo de permanência (min) | Exaustão |
|-------|--------------|----------------------------|----------|
| 1 | 900 | 2,5 + t | FAN 1 |
| 2* | 0 | Até atingir 50 °C | FAN 3 |

t: tempo de extração; onde t = 2,5 min para alga e peixe, e t = 20 min para arroz.

* Etapa de resfriamento

Após todos os procedimentos de extração, os extratos ficaram em repouso por pelo menos 30 min, para que o material sólido (amostra) decantasse. Cabe destacar que esse tempo de decantação foi necessário devido à dificuldade na separação entre o sólido e o líquido, mesmo podendo acarretar interpretação errônea dos resultados uma vez que o extrato ficou em contato com o sólido por mais tempo do que aquele estabelecido para a extração. Com o auxílio de uma seringa, cerca de 15 mL do sobrenadante foram transferidos para outro frasco e centrifugados por 5 min a 1000 g. Os extratos centrifugados foram filtrados em filtros com poros de 0,45 µm, foram transferidos para outro frasco, sendo estes mantidos refrigerados após esse procedimento até a etapa de medição.

4.6.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas

O sistema MultiWave Pro, utilizado para as extrações por MAE, também foi utilizado para a decomposição assistida por micro-ondas (MAD) para posterior determinação de As total e de outros elementos. Cerca de 500 mg das amostras foram pesadas diretamente para os frascos, seguido da adição de 6 mL de HNO₃ concentrado. Após o fechamento, os frascos foram posicionados no rotor, o qual foi inserido na cavidade do forno de micro-ondas, onde foi aplicado o programa de irradiação descrito na Tabela 3. Ao final desse programa, os digeridos foram coletados e avolumados a 25 mL com água. Após a etapa de decomposição, o sistema foi descontaminado como descrito no item 4.6.1.

Tabela 3 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por MAD.

| Etapa | Potência (W) | Rampa (min) | Tempo de permanência (min) | Exaustão |
|-------|--------------|-------------|----------------------------|----------|
| 1 | 900 | 10 | 20 | FAN 1 |
| 2* | 0 | - | Até atingir 50 °C | FAN 3 |

Taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s⁻¹; temperatura máxima: 280 °C; pressão máxima: 80 bar.

* Etapa de resfriamento

4.6.3 Combustão iniciada por micro-ondas

Visando a determinação de Cl para avaliação de interferência desse elemento na determinação de As pela técnica de ICP-MS, as amostras também foram decompostas utilizando combustão iniciada por micro-ondas (MIC) no sistema Multiwave Pro. Foram feitos comprimidos das amostras com massa de cerca de 500 mg com o auxílio de uma prensa hidráulica (modelo Hydraulic Press, Specac), por 1 min à 3 ton. Os comprimidos foram alocados juntamente com um papel filtro (cerca de 15 mm de diâmetro) na base do suporte de quartzo, sendo o papel umedecido com 50 µL de uma solução de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹. O suporte, contendo o papel filtro e o comprimido da amostra, foi inserido dentro de um frasco de quartzo onde foram adicionados, previamente, 6 mL de solução absorvedora (NH₄OH 100 mmol L⁻¹). Após o fechamento dos frascos, esses foram acomodados no rotor e pressurizados com O₂ (99,5%, White Martins/Praxair) a 20 bar. O rotor foi então colocado na cavidade do forno micro-ondas e iniciado o programa de irradiação, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por MIC.

| Etapa | Potência (W) | Tempo de permanência (min) | Exaustão |
|-------|--------------|----------------------------|----------|
| 1 | 900 | 5 | FAN 1 |
| 2* | 0 | Até atingir 50 °C | FAN 3 |

Taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s⁻¹; temperatura máxima: 280 °C; pressão máxima: 80 bar.

* Etapa de resfriamento

Ao final do programa de irradiação e resfriamento, os frascos foram lentamente despressurizados e a solução foi transferida para frascos volumétricos, sendo o digerido final avolumado a 25 mL com água.

4.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS

A fim de obter melhor separação das espécies utilizando a técnica de LC-ICP-MS, foram avaliadas colunas de troca aniônica e catiônica. As condições de eluição (fase móvel, tempo de eluição, vazão da fase móvel, entre outros parâmetros) foram escolhidas com base em trabalhos prévios da literatura.^{51,56,57,58,59} No entanto, as condições foram modificadas e avaliadas para que possibilitassem a separação adequada das espécies, como uma separação dos picos de cada espécie e com tempo de separação cromatográfica coerente com o reportado para a especiação de As, utilizando a técnica de LC-ICP-MS.

Quando utilizada a coluna de troca aniônica foram avaliados como fase móvel $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ou combinações entre duas, enquanto para a coluna de troca catiônica, além do $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, também foi avaliada a piridina, como mostrado na Tabela 5. As condições que foram modificadas para obtenção de melhor separação foram a vazão da fase móvel, a proporção entre as fases móveis, o pH e o tempo eluição. Para essas avaliações foi utilizada uma solução mista das espécies de As, na concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie, sendo As(III), As(V), DMA, MMA e AsB, para a coluna de troca aniônica e As(III), As(V) e AsB, para a coluna de troca catiônica.

Tabela 5 - Condições de eluição avaliadas para especificação de As por LC-ICP-MS.

| Coluna de troca aniônica (PRP-X100) | | |
|---|--|------------|
| Eluição | Fase móvel | Referência |
| 0 - 0,5 min: 100% de A 0,5 - 13 min: 100% de B | A: $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$ 10 mmol L ⁻¹ em metanol 2% (v/v), pH 9,0 B: $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$ 50 mmol L ⁻¹ em metanol 2% (v/v), pH 9,0 | 56 |
| 0 - 1,4 min: 30% de A 1,4 - 2,7 min: 100% de B 2,7 - 15 min: 30% de A | A: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 20 mmol L ⁻¹ , pH 6,0 B: $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$ 20 mmol L ⁻¹ , pH 8,5 | 57 |
| 0 - 15 min: 100% de A | A: $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 8,0 mmol L ⁻¹ , pH 8,0 | 59 |
| Coluna de troca catiônica (PRP-X200) | | |
| Eluição | Fase móvel | Referência |
| 0 - 4,5 min: 10% de A e 90% de B 4,6 - 11 min: 40% de A e 60% de B 11,1 - 15 min: 10% de A e 90% de B | A: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 100 mmol L ⁻¹ , pH 4,5 B: H ₂ O | 51 |
| 0 - 10 min: 100% de A | A: Piridina 2,5 mmol L ⁻¹ , pH 2,65 | 58 |

Adicionalmente, é importante salientar que com a sequência dos experimentos ocorreu alteração no desempenho das colunas de troca aniônica, devido ao longo período de uso, sendo necessária a adaptação das condições de separação escolhidas. Visando continuar tendo boa separação entre as espécies, foi feita alteração na concentração da fase móvel [$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 8,0 mmol L⁻¹] utilizada. Em função disso, também foi necessária uma adequação do tempo de eluição.

As áreas dos sinais cromatográficos foram integradas utilizando o *software* Origin 8 (versão 8.0724, OriginLab Corporation). Os resultados para quantificação e eficiência de extração foram avaliados estatisticamente utilizando o *software* GraphPad InStat versão 3.0. Foram utilizados o teste *t-student*, para comparação de duas médias e a análise de variância (ANOVA) para comparação de três ou mais valores de média. Para ambos os testes foi considerado um nível de confiança de 95%.

4.8 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO

Os métodos de extração (convencional, MAE e UAE) foram avaliados em paralelo para cada uma das matrizes quanto aos parâmetros que influenciam na eficiência de extração. Nessas avaliações, não foram avaliados parâmetros como a massa de amostra, o volume de solução extratora e o volume final. Por outro lado, foram avaliados parâmetros como o tipo da solução extratora, a concentração da solução extratora, tempo de extração e temperatura de extração. Esses parâmetros, bem como as variações estudadas, foram escolhidos em função de estudos prévios reportados na literatura,^{3,8,24} onde essas são as condições comumente utilizadas para extração de As e posterior quantificação de espécies do elemento, em diferentes tipos de amostras.

Adicionalmente aos parâmetros avaliados quanto a eficiência de extração das espécies de As nas amostras, foi avaliada a estabilidade dessas espécies quanto a fatores como a solução extratora, a adição de íons em solução de referência e adição de Fe^{2+} na amostra. A seguir serão detalhados os experimentos feitos para essas avaliações.

4.8.1 Avaliação da eficiência da extração de arsênio

4.8.1.1 Escolha do tipo da solução extratora

As soluções extratoras avaliadas quanto a eficiência de extração de As total foram H_2O , metanol: H_2O 1:1 (v/v), HNO_3 e H_3PO_4 , ambos ácidos na concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Nessa avaliação foram fixos os seguintes parâmetros: 200 mg de amostra, 10 mL de solução extratora, tempo de extração de 2,5 min e temperatura de extração de $75 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo os frascos avolumados com água a 25 mL após a extração.

4.8.1.2 Concentração da solução extratora

A concentração de HNO_3 como solução extratora foi avaliada tanto para eficiência de extração de As total, quanto para a avaliação de conversão das

espécies de As nas amostras. Nesses ensaios a massa de amostra, volume de solução extratora e volume final do extrato foram mantidos em 200 mg, 10 mL e 25 mL, respectivamente. Para a avaliação da conversão das espécies em alga e arroz, além de H₂O, foi avaliado HNO₃ como solução extratora nas concentrações de 0,01, 0,025, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 e 1,0 mol L⁻¹, enquanto para o peixe foi avaliado apenas HNO₃ 1,0 mol L⁻¹. As condições de tempo e temperatura de extração foram de 2,5 min e 75 °C, para alga e peixe, e 20 min e 85 °C, para arroz, respectivamente.

Para os ensaios envolvendo a avaliação da eficiência de extração de As total foram investigadas H₂O e soluções de HNO₃ com concentração de 0,01, 0,025, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 e 1,0 mol L⁻¹ sendo que os demais parâmetros adotados para extração não foram alterados: 200 mg de amostra, 10 mL de solução extratora, tempo de extração de 2,5 min e temperatura de extração de 75 °C, sendo os frascos avolumados com água a 25 mL após a extração.

4.8.1.3 Tempo de extração

O tempo de extração foi avaliado em 2,5, 5, 10, 20 e 30 min para as amostras de alga e arroz, aplicando as demais condições como 200 mg de amostra, 10 mL de HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ como solução extratora, temperatura de extração de 75 °C e 25 mL como volume final dos extratos.

4.8.1.4 Temperatura de extração

A avaliação da temperatura de extração foi feita para as amostras de alga e arroz, sendo fixas as condições de 200 mg de amostra, 10 mL de HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ como solução extratora, tempo de extração de 2,5 min e 20 min para alga e arroz, respectivamente, e 25 mL como volume final dos extratos. As temperaturas avaliadas foram de 75 e 85 °C para todos os sistemas de extração. A temperatura de 100 °C foi avaliada apenas para MAE, uma vez que apenas nesse sistema foi possível atingir essa temperatura.

4.8.2 Avaliação da estabilidade das espécies de arsênio

4.8.2.1 Avaliação da solução extratora e concentração de HNO_3

A avaliação da solução extratora frente a soluções de referência das espécies de As foi feita utilizando H_2O e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para isso, foram fixadas as condições de 10 mL de solução extratora, 20 min de extração, temperatura de extração de $85 \text{ }^\circ\text{C}$ e volume final de 25 mL. Os experimentos foram feitos separadamente para cada espécie, sendo adicionada uma quantidade conhecida das espécies As(III), As(V), DMA, MMA e AsB para que a concentração final fosse de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, de cada espécie.

4.8.2.2 Avaliação da presença de íons Cu , Fe e Zn na solução de referência

Na avaliação do efeito de íons Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} , soluções contendo separadamente as espécies de As(III) e As(V), na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, foram submetidas ao procedimento de UAE. Para isso, foi utilizado o banho de ultrassom na condição de 60% de amplitude e nas frequências de 35 e 130 kHz. Os Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} foram adicionados separadamente ao extrato para que a concentração fosse de 10 mg L^{-1} de cada íon no volume final de 25 mL. Foi utilizada como solução extratora 10 mL de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, temperatura de extração de $85 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de extração de 20 min. Posteriormente, esse mesmo ensaio foi feito para as espécies DMA, MMA e AsB na presença de Fe^{3+} , utilizando as mesmas condições dos ensaios anteriores.

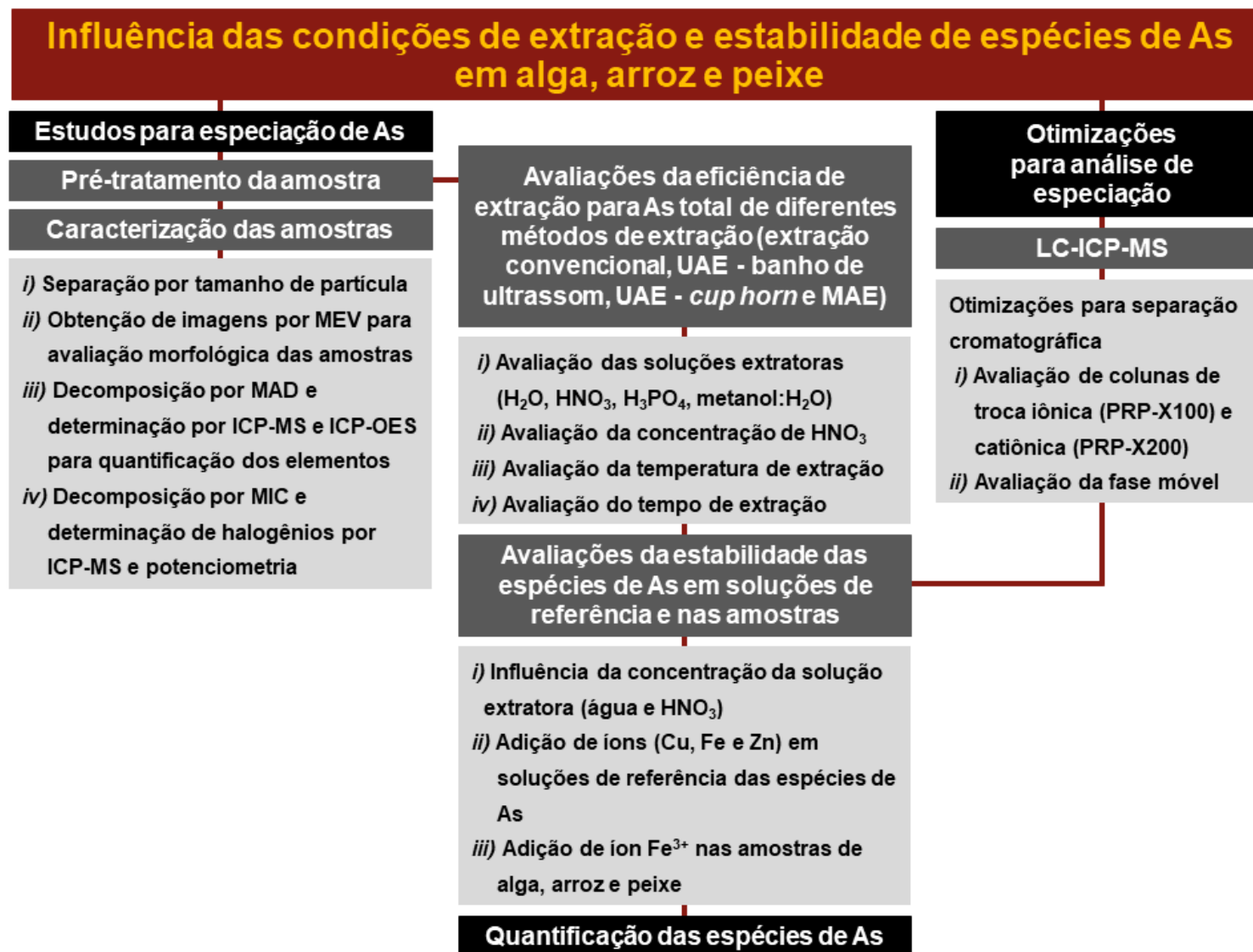
4.8.2.3 Adição de Fe^{3+} às amostras

A adição de Fe^{3+} nas amostras foi feita para que a concentração adicionada fosse 2, 5 e 10 vezes superior à concentração de Fe presente em cada uma das amostras. Assim, os extratos (avolumados a 25 mL) apresentaram concentrações de Fe de 3,2, 8,2 e $16,4 \text{ mg L}^{-1}$ para a alga, 0,2, 0,5 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o arroz e 0,19, 0,47 e $0,94 \text{ mg L}^{-1}$ para o peixe. Para as três amostras foram utilizados 200 mg de amostra e 10 mL de solução extratora, sendo utilizados como solução extratora, tempo e temperatura de extração, HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, 2,5 min e $75 \text{ }^\circ\text{C}$ para a alga,

HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, 20 min e 85 °C para o arroz, e H₂O, 2,5 min e 75 °C para o peixe, respectivamente. Cabe destacar que a adição de Fe³⁺ foi feita após a etapa de pesagem da amostra e previamente a extração.

Na Figura 1 está mostrado um fluxograma resumido de todos experimentos feitos para avaliação de eficiência de extração e estabilidade das espécies de As nas amostras de alga, arroz e peixe.

Figura 1 - Fluxograma dos experimentos de avaliação da extração e estabilidade de espécies de As em alga, arroz e peixe.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

A escolha das matrizes foi feita levando em consideração informações de trabalhos publicados,^{15,16,17} onde alguns relatam quais espécies são comumente encontradas e em qual tipo de matriz. A espécie de As a ser encontrada em cada tipo de organismo, seja animal ou vegetal, irá depender do ambiente em que este está localizado e/ou da rota metabólica do As nesse organismo. Dentre as matrizes mais citadas em trabalhos de especificação de As está o arroz, sendo que esse geralmente apresenta concentração variável (da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$) de iAs, DMA e/ou MMA. Quando consideradas as espécies orgânicas, são bastante comuns trabalhos onde é estudada a distribuição dessas espécies em organismos marinhos. Amostras como algas marinhas comumente apresentam espécies como AsSug e AsLip, sendo a primeira a espécie de As majoritária (mais que 80%) nesse tipo de organismo. Por outro lado, a espécie mais abundante em organismos marinhos é a AsB, principalmente em seres que estão no topo da cadeia alimentar como, por exemplo, os peixes predadores.¹⁵

Em função das particularidades das matrizes supracitadas em relação à presença das espécies de As, as amostras de alga, arroz e peixe foram escolhidas para a execução dos estudos quanto aos procedimentos de extração, de quantificação e de conversão das espécies de As. Previamente aos procedimentos de preparo de amostra (decomposição e/ou extração), cada uma delas passou por um pré-tratamento adequado.

Após os processos de moagem, a quantidade total de cada amostra moída foi separada em função tamanho de partícula, sendo utilizado para isso um tamisador eletromagnético. A quantidade de amostra que ficou retida em cada uma das peneiras foi pesada e armazenada em geladeira. Para os experimentos de extração, optou-se por escolher as alíquotas que tivessem maior quantidade de amostra, do menor tamanho possível, tendo em vista que a área superficial de amostra é um fator importante para a extração. Logo, foram utilizadas amostras com tamanho de partícula entre 45 e 180 μm para as amostras de alga e peixe, e entre 180 e 300 μm para arroz, uma vez que as demais frações não apresentaram uma fração de massa suficiente para conduzir os experimentos.

Adicionalmente, foram obtidas imagens por MEV das amostras, com o objetivo de visualizar a morfologia e identificar possíveis mudanças nela antes e após os procedimentos de extração, principalmente quando consideradas as alíquotas submetidas ao ultrassom. Esses resultados serão discutidos no item 5.6.

5.2 DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS POR MAD E MIC PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR

As amostras de alga, arroz e peixe foram decompostas para a caracterização quanto a sua composição elementar. Para isso, as amostras foram decompostas por MAD para posterior quantificação de metais e não metais por ICP-MS e ICP-OES, bem como por MIC, cujos digeridos foram usados para a quantificação de F (por potenciometria), Cl, Br e I (por ICP-MS). Na Tabela 6 estão mostrados os resultados para estes elementos nas três amostras analisadas.

Tabela 6 - Resultados para determinação de elementos em alga, arroz e peixe por ICP-MS^a, ICP-OES^b e ISE^c. Concentração expressa em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 3).

| Analito | Alga | Arroz | Peixe |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Al ^b | 64,9 \pm 3,1 | < 7,9 | < 7,9 |
| Ag ^a | 0,041 \pm 0,004 | < 0,005 | 0,017 \pm 0,002 |
| As ^a | 18,8 \pm 1,8 | 0,713 \pm 0,008 | 65,9 \pm 1,5 |
| Ba ^a | 14,9 \pm 1,7 | 0,622 \pm 0,028 | 0,148 \pm 0,004 |
| Bi ^a | < 0,02 | < 0,02 | < 0,02 |
| Br ^a | 49,5 \pm 1,6 | 0,756 \pm 0,013 | 13,1 \pm 0,6 |
| Ca ^b | 3696 \pm 54 | 86,2 \pm 12,2 | 247 \pm 4 |
| Cd ^a | 1,44 \pm 0,11 | 0,011 \pm 0,001 | 0,038 \pm 0,001 |
| Cl ^a | 6852 \pm 24 | 208 \pm 4 | 3241 \pm 101 |
| Co ^a | 0,149 \pm 0,016 | 0,060 \pm 0,002 | 0,013 \pm 0,001 |
| Cr ^a | 0,438 \pm 0,019 | 0,060 \pm 0,015 | 0,284 \pm 0,019 |
| Cu ^a | 22,3 \pm 2,3 | 1,65 \pm 0,04 | 1,35 \pm 0,07 |
| F ^c | < 5,3 | < 5,3 | < 5,3 |
| Fe ^b | 205 \pm 3 | 12,8 \pm 2,3 | 11,8 \pm 1,0 |
| K ^b | 12038 \pm 69 | 1676 \pm 41 | 8389 \pm 90 |
| I ^a | 49,4 \pm 3,1 | 0,013 \pm 0,001 | 0,352 \pm 0,008 |
| Mg ^b | 2840 \pm 44 | 1523 \pm 30 | 1038 \pm 19 |
| Mn ^a | 23,4 \pm 2,6 | 26,3 \pm 3,0 | 1,11 \pm 0,10 |
| Mo ^a | 0,699 \pm 0,062 | 0,457 \pm 0,006 | 0,016 \pm 0,001 |
| Na ^b | 6273 \pm 19 | < 7,2 | 3873 \pm 141 |
| Ni ^a | 0,856 \pm 0,060 | 0,518 \pm 0,054 | 0,107 \pm 0,013 |
| P ^b | 5876 \pm 27 | 3343 \pm 31 | 7997 \pm 95 |
| Pb ^a | 0,315 \pm 0,014 | < 0,127 | 0,648 \pm 0,066 |
| S ^b | 19954 \pm 236 | 999 \pm 11 | 6268 \pm 229 |
| Sb ^a | < 0,24 | < 0,24 | < 0,24 |
| Se ^a | 0,280 \pm 0,036 | < 0,03 | 2,00 \pm 0,05 |
| Sn ^a | 0,575 \pm 0,075 | 0,164 \pm 0,004 | 0,172 \pm 0,023 |
| Sr ^b | 32,3 \pm 0,5 | 0,557 \pm 0,146 | 0,804 \pm 0,056 |
| V ^a | 0,864 \pm 0,076 | 0,031 \pm 0,002 | 0,011 \pm 0,001 |
| Zn ^a | 28,4 \pm 3,6 | 17,9 \pm 1,9 | 28,2 \pm 0,4 |

Como pode ser observado na Tabela 6, a amostra de peixe foi a que apresentou maior concentração de As total (65,9 $\mu\text{g g}^{-1}$), seguido pela alga (18,8 $\mu\text{g g}^{-1}$) e pelo arroz (0,713 $\mu\text{g g}^{-1}$). A concentração dos outros elementos variou bastante nas amostras, sendo possível destacar que a concentração de elementos

como Al, Ca, Cu, Fe, I, K, S e Sr foi bastante superior para a amostra de alga, enquanto Br foi encontrado em alta concentração tanto na alga quanto no peixe.

Cloro também foi determinado nas amostras, uma vez que a determinação de As pela técnica de ICP-MS é feita monitorando o isótopo ^{75}As , o qual está sujeito à interferência oriunda do íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$.⁶⁰ A concentração de Cl nas amostras variou de 208 a 6852 $\mu\text{g g}^{-1}$. Nesse sentido, foi possível concluir que mediante a diluição dos extratos, tanto na etapa de preparo de amostra (extração e/ou decomposição) quanto na medição, a concentração de Cl no extrato e/ou digerido foi inferior a 2,3 mg L^{-1} , para todas as amostras analisadas. Cabe destacar que tem sido reportado na literatura que até 50 mg L^{-1} de Cl não causam interferência na determinação de As.⁶¹ Sendo assim, foi possível concluir que a concentração de Cl presente nas amostras não poderia causar influência nas medições feitas pela técnica de ICP-MS.

5.3 OTIMIZAÇÕES PARA ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO POR LC-ICP-MS

Tendo em vista a necessidade da separação e quantificação das espécies de As, foram feitos estudos para avaliar a melhor condição de separação para as espécies As(III), As(V), AsB, DMA e MMA. Para isso, foram avaliadas duas colunas, uma de troca aniônica e outra de troca catiônica, sendo a primeira a mais empregada para separação das espécies iAs, DMA e MMA, enquanto a segunda, a mais utilizada para espécies oAs, como AsB, TMAO, entre outras.

Quando são usadas colunas de troca aniônica, as fases móveis mais empregadas são os fosfatos de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$ e carbonato de amônio. A concentração, pH e meio (aquoso ou alcóolico) em que essas soluções são usadas podem variar, bem como o modo de eluição (gradiente ou isocrático). Nessa avaliação foram escolhidas três condições descritas na literatura (Tabela 5) para esse tipo de coluna, visando a separação de As(III), As(V), AsB, DMA e MMA. Dentre essas condições, foram feitas algumas variações para obtenção de uma melhor separação, com boa resolução e com menor tempo de eluição possível.

Em nenhuma das condições avaliadas foi obtida uma boa separação entre os picos de As(III) e AsB. Considerando que alguns trabalhos reportam uma separação eficiente dessas duas espécies utilizando algumas das condições estudadas e o mesmo tipo/modelo de coluna avaliada, inferiu-se que não foi possível uma boa

separação devido ao fato de as colunas disponíveis terem sido usadas por um longo período tempo. Assim, a partir desses estudos, foi obtida uma boa separação utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase móvel para especificação de As(III), As(V), DMA e MMA, sem considerar a espécie AsB. Na Tabela 7 estão mostradas as demais condições de eluição utilizadas para a coluna de troca aniônica. A separação para uma solução de referência na condição escolhida está mostrada na Figura 2, onde pode ser observada uma boa separação das quatro espécies investigadas.

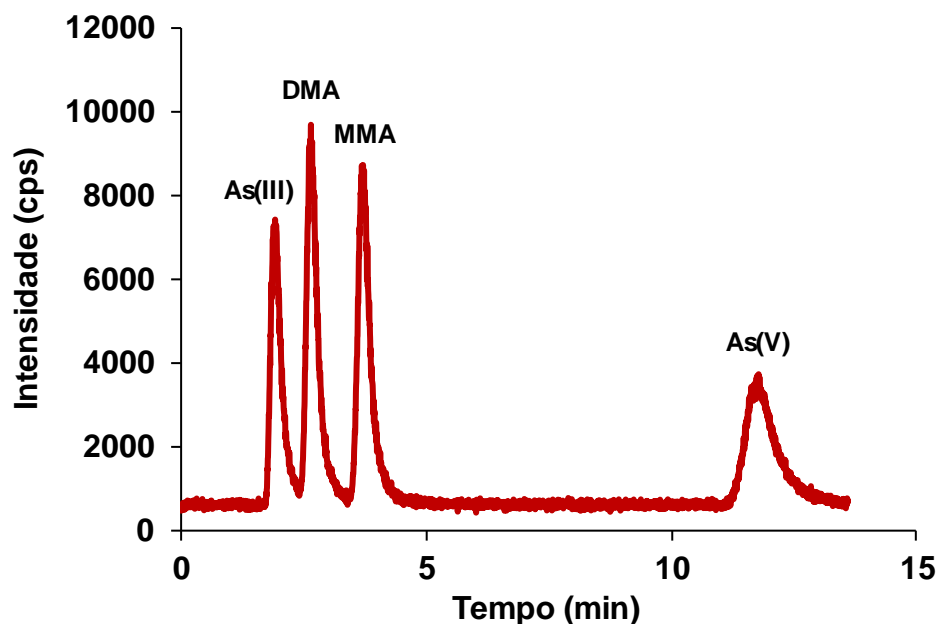
Tabela 7 - Condições otimizadas para especificação de As por LC-ICP-MS.

| Parâmetro | Coluna | |
|--------------------------------|--|---|
| | Troca aniônica (PRP-X100) | Troca catiônica (PRP-X200) |
| Fase móvel | $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0^{\text{a}}$ mmol L^{-1} | Piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ |
| pH | 8,0 | 2,65 |
| Vazão (mL min^{-1}) | 1,5 | 1,5 |
| Programa de eluição | 0 - 13^{b} min: 100% $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 8 mmol L^{-1} | 0 - 10 min: 100% Piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ |
| Amostras | Alga e arroz | Peixe |
| Espécies | As(III), As(V), DMA e MMA | As(III), As(V) e AsB |

^a Com o tempo de uso da coluna de troca aniônica, a concentração da fase móvel foi alterada para $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para manter a separação adequada das espécies.

^b Quando a concentração da fase móvel foi alterada para $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o tempo de eluição utilizado foi 18 ou 21 min.

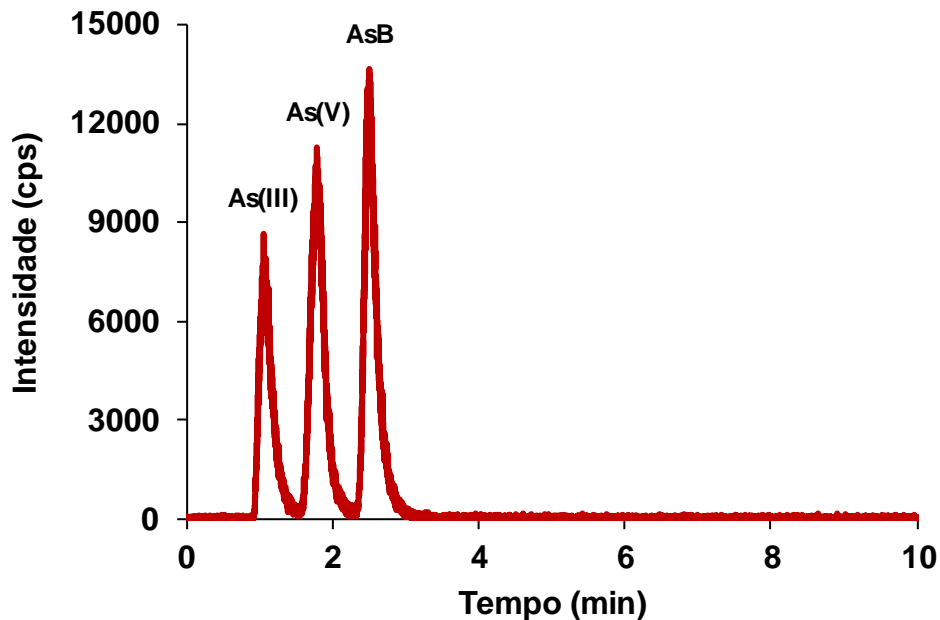
Figura 2 - Perfil cromatográfico obtido por LC-ICP-MS para solução de referência de As(III), As(V), DMA e MMA contendo $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie para coluna de troca aniônica.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: NexION.

Como não foi possível uma boa separação da espécie AsB, optou-se pela avaliação da coluna de troca catiônica para a separação dessa espécie. O mesmo tipo de avaliação feito para a coluna de troca aniônica foi feito para a coluna de troca catiônica. Para isso, foram escolhidas duas condições descritas na literatura (Tabela 5), que utilizam como fase móvel piridina e $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$. Assim como na avaliação anterior, foram feitos ensaios para obtenção de uma boa separação para as espécies de As(III), As(V) e AsB, onde as condições de partida foram avaliadas e modificadas para melhorar a separação. Como mostrado na Tabela 7, a condição de eluição utilizando 100% de piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase móvel foi a mais adequada, possibilitando uma boa separação das espécies As(III), As(V) e AsB (Figura 3). Adicionalmente, foram feitos ensaios para a obtenção dos tempos de retenção utilizando a coluna de troca catiônica para as espécies MMA ($t_R = 1,27 \text{ min}$) e DMA ($t_R = 1,63 \text{ min}$), onde foi observada uma boa separação dessas espécies da espécie AsB (predominante no peixe).

Figura 3 - Perfil cromatográfico obtido por LC-ICP-MS para solução de referência de As(III), As(V) e AsB contendo $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie para coluna de troca catiônica.



Condições de separação: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: NexION.

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL

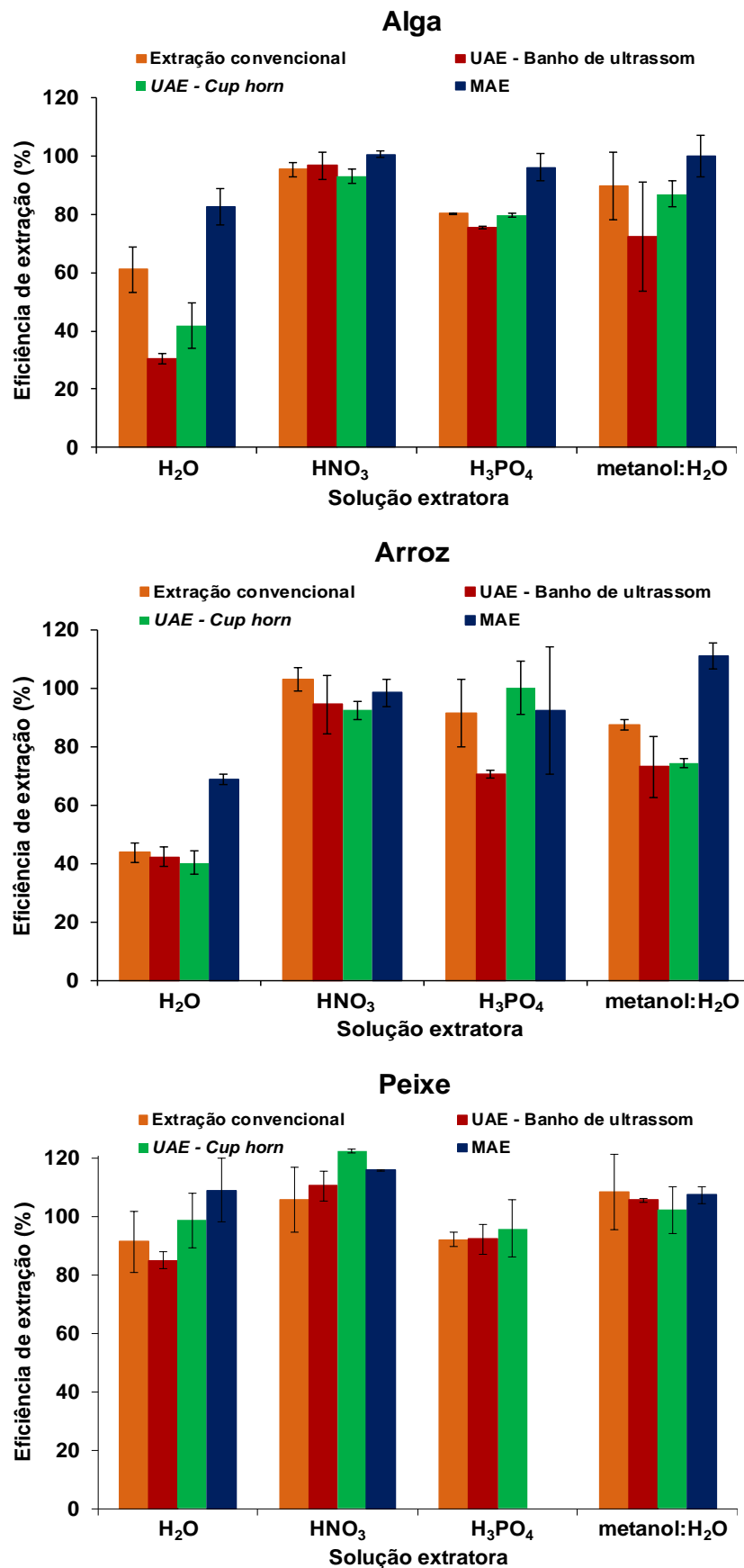
Previamente à especificação de As nas amostras, foram feitos ensaios com o objetivo de avaliar a eficiência da extração de As total, utilizando diferentes meios de extração. Visando obter maior eficiência de extração, foram estudados alguns parâmetros, como a solução extratora, a temperatura e o tempo de extração. As demais condições empregadas inicialmente e mantidas constantes durante os experimentos (massa de amostra, volume de solução extratora e volume final de extrato), bem como as condições que foram avaliadas, foram escolhidas com base em trabalhos descritos na literatura para a especificação de As.^{3,4,8} A seguir serão discutidos os principais resultados para essas avaliações e serão discutidos alguns dados referentes a separação cromatográfica, uma vez que os resultados para a especificação, principalmente para a amostra de alga, impactaram na escolha da concentração da solução extratora.

5.4.1 Avaliação da solução extratora

A escolha da solução a ser utilizada para extração visando a posterior especiação é bastante importante, tanto pela desejável alta eficiência e transferência de fase do analito/espécies, quanto em ser compatível com a técnica de separação e determinação das espécies. A maioria dos trabalhos utilizam H_2O , HNO_3 , H_3PO_4 ou mistura de metanol e H_2O como soluções extratoras, sendo as três últimas utilizadas em diferentes concentrações e/ou proporções.^{3,4}

Assim, foram utilizadas soluções de HNO_3 , H_3PO_4 e H_2O para avaliar a eficiência de extração. Para as soluções ácidas, optou-se pelo uso da concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para a mistura metanol: H_2O , foi escolhida a proporção 1:1. Os resultados estão mostrados na Figura 4, os quais estão expressos como eficiência de extração, onde a concentração de As total (após decomposição por MAD e detecção por ICP-MS) foi considerada como 100%.

Figura 4 - Influência das soluções extratoras na eficiência de extração de As total em alga, arroz e peixe utilizando diferentes métodos de extração.



Para a alga, as eficiências de extração variaram entre 30 e 101%, onde a H₂O foi o extrator menos eficiente (entre 30 e 83%), independente do sistema de extração utilizado. Para as demais soluções, a eficiência foi adequada (entre 80 e 101%). Um comportamento bastante semelhante foi observado para a extração de As em arroz, onde as eficiências de extração variaram de 40 a 111%, quando consideradas todas as condições. Novamente, foram obtidas eficiências mais baixas quando foi utilizada H₂O (entre 40 e 69%) e melhores eficiências foram obtidas para as demais soluções (entre 74 e 111%). Para o peixe, foram obtidas eficiências de extração entre 85 e 122% para todas as soluções e sistemas de extração avaliados.

As soluções de H₃PO₄ e metanol:H₂O, apesar de proporcionarem boas eficiências de extração para as três amostras, de 70 a 100% e de 72 a 111%, respectivamente, não foram consideradas soluções extratoras adequadas considerando uma posterior separação cromatográfica. No caso do H₃PO₄, o extrato foi de difícil filtração, impossibilitando a obtenção de volume suficiente de extrato para medições em mais de uma replicata. Por exemplo, para as extrações feitas para o peixe utilizando MAE, o extrato possuía o aspecto de suspensão, impossibilitando a separação das fases. Ao submeter esse extrato a etapa de filtração, o filtro se rompia logo após o início da filtração, impossibilitando a obtenção do filtrado para a determinação de As.

De maneira geral, considerando-se todos os aspectos mencionados para as 3 amostras e os 4 sistemas de extração, a solução de HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ foi a mais adequada para a extração de As de arroz e alga, enquanto que a H₂O foi escolhida como solução extratora para peixe. Contudo, tendo em vista a preocupação com a preservação das espécies de As, foram feitos alguns ensaios para avaliar a integridade das espécies após a extração mediante a separação cromatográfica, os quais serão discutidos posteriormente (item 5.4.2).

5.4.2 Avaliação da concentração de HNO₃

5.4.2.1 Avaliação da estabilidade de espécies de As em alga em função da concentração de HNO₃

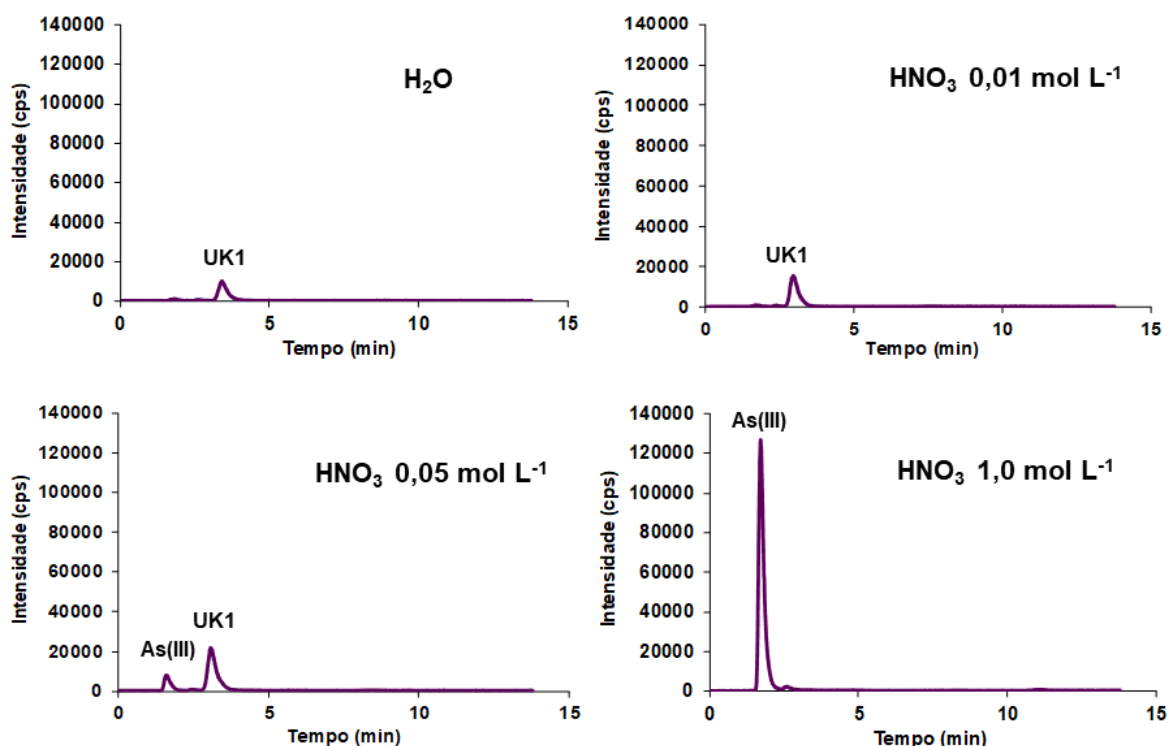
Como a eficiência de extração foi satisfatória empregando HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ como solução extratora para alga, foram feitos experimentos para observar o

comportamento das espécies após a extração. Para esse ensaio, foram feitas extrações nas amostras de alga utilizando H_2O e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando os 4 sistemas de extração. No caso da alga, as espécies presentes são majoritariamente orgânicas, geralmente AsSug ou AsLip, logo a conversão dessas espécies para iAs pode ser facilmente observada, caso ocorresse. A condição de separação utilizada foi a descrita na Tabela 7, para a coluna de troca aniônica.

Quando os extratos foram analisados, foi avaliado o fator de diluição mínimo necessário e a adição de concentração conhecida das espécies na amostra diluída. Quanto à diluição, foi observado que utilizar a própria fase móvel para isso foi mais adequado, uma vez que não foi observada oscilação/vale (*drift*) na linha base do cromatograma, diferente do que foi observado quando a amostra foi diluída em H_2O , por exemplo. Para esses experimentos foi escolhido um fator de diluição de 10 vezes para essa amostra, sendo esse fator escolhido levando em consideração a concentração de As total na alga e a obtenção de concentração similar àquela utilizada para otimização da separação cromatográfica. Quanto ao ensaio de adição de espécies [As(III), As(V), DMA e MMA], foi possível observar uma boa separação, mesmo na presença da matriz. É importante destacar que esses experimentos para avaliação da estabilidade não foram quantitativos, onde foi avaliada visualmente alteração das áreas dos picos.

Após esses ensaios, foram obtidos os cromatogramas utilizando H_2O como solução extratora (Figura 5) e foi possível observar a presença de um pico de maior área no t_R de 2,93 min. Contudo, para a extração feita com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ não foi observado nenhum pico nesse t_R , mas foi observado um pico no t_R de 1,78 min, para todos os procedimentos de extração utilizados. Cabe destacar que o t_R de 2,93 min não foi o mesmo t_R de nenhuma das espécies presentes na solução de referência utilizada, indicando a presença de uma espécie desconhecida de As (UK1). Além disso, o t_R de 1,78 min foi o mesmo t_R da espécie de As(III) na solução de referência, indicando que a espécie desconhecida possivelmente foi convertida a As(III) com o uso de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e aquecimento, para todos os sistemas de extração. Os cromatogramas mostrados na Figura 5 são dos extratos obtidos para UAE - *cup horn*, os quais apresentaram comportamento muito similar aos obtidos para extração convencional, UAE - banho de ultrassom e MAE.

Figura 5 - Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS para espécies de As extraídas de alga utilizando HNO_3 e H_2O como solução extratora e UAE - *cup horn*.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: NexION.

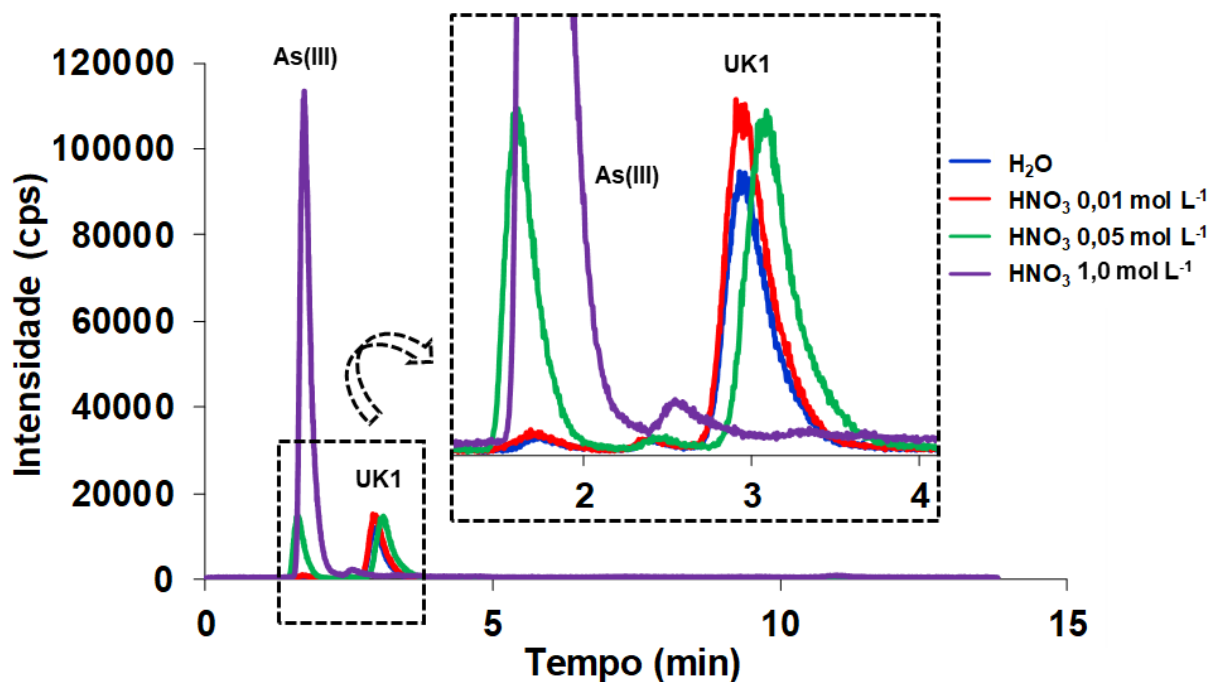
Assim, tendo em vista que a única diferença entre os extratos foi a solução extratora empregada, é possível afirmar que com a utilização de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ocorreu a conversão da espécie de As desconhecida (UK1) presente na alga. Também é importante destacar que as áreas dos picos para as extrações com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ são superiores em relação às extrações com H_2O como solução extratora. Isso corrobora com o fato da eficiência de extração ter sido maior utilizando ácido, logo a intensidade/área nos cromatogramas também foi maior.

Nesse sentido, foram feitos estudos a fim de avaliar se ocorreria conversão da espécie UK1 com soluções mais diluídas de HNO_3 ($0,05$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Os cromatogramas para os experimentos com HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ também estão mostrados na Figura 5 onde é possível observar que mesmo utilizando HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ mais diluído ocorre conversão da espécie UK1. Quando considerados os outros métodos de extração (resultados não mostrados), foi possível observar o mesmo comportamento da espécie UK1, onde ocorria maior conversão à As(III) quando aumentada a concentração de HNO_3 . Além disso, pelo perfil dos

cromatogramas, também foi possível concluir que quando utilizado o banho de ultrassom, ocorreu menor conversão, enquanto a proporção da conversão foi maior quando utilizado MAE.

Por outro lado, a utilização de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ possibilitou a extração da espécie orgânica de As sem conversão aparente (Figura 5). Entretanto, cabe salientar que a área dos picos para as espécies utilizando HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi inferior as áreas quando utilizado HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, indicando uma menor eficiência de extração. Para melhor compreensão da influência da concentração da solução extratora na conversão da espécie de As, os cromatogramas utilizando H_2O , HNO_3 $0,01$, $0,05$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para extração por MAE foram sobrepostos e estão mostrados na Figura 6. Pode ser observado que quando utilizado H_2O e HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, o perfil dos cromatogramas foi bastante similar, indicando que para essas duas soluções extradoras não ocorreu conversão das espécies, porém com menor eficiência de extração (resultados serão discutidos no item 5.4.2.4) quando comparado com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 6 - Cromatogramas sobrepostos para espécies de As extraídas de alga utilizando H_2O , HNO_3 $0,01$, $0,05$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ como soluções extradoras e MAE.



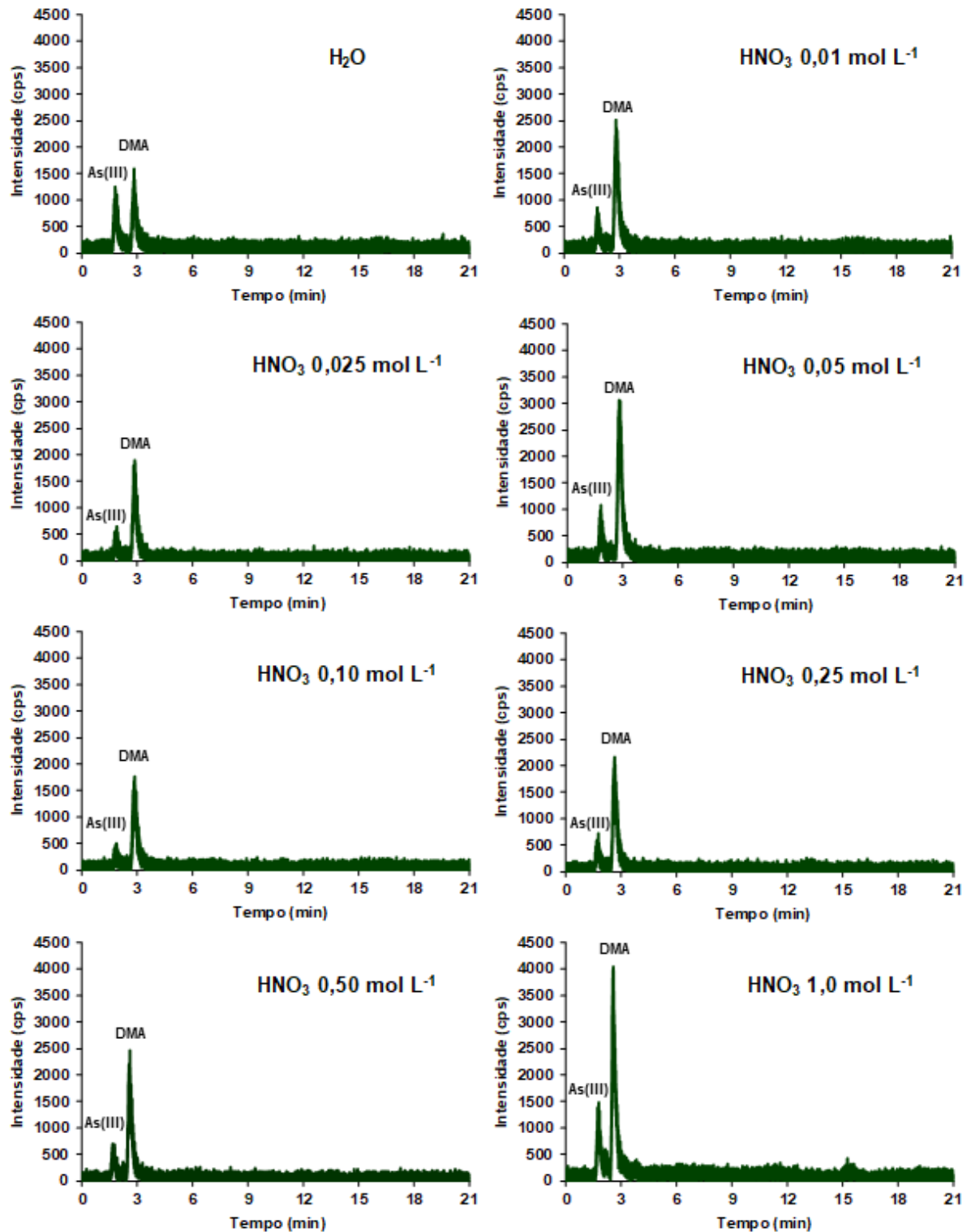
Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: NexION.

5.4.2.2 Avaliação da estabilidade de espécies de As em arroz em função da concentração de HNO₃

Ensaio similares aos feitos com a alga também foram feitos com o arroz, a fim de avaliar a estabilidade das espécies de As em função da concentração da solução extratora. Para isso, foram feitos ensaios empregando H₂O e concentrações crescentes de HNO₃, nas condições previamente otimizadas de temperatura e tempo de extração, 85 °C e 20 min, respectivamente, como será descrito nos itens 5.4.3 e 5.4.4.

As condições empregadas para a análise de especiação são as descritas no item 5.3 (Tabela 7), onde a coluna de troca aniônica foi utilizada para a amostra de arroz. Cabe ressaltar que esses experimentos, assim como os feitos para a alga na avaliação preliminar da estabilidade, não foram quantitativos. Na Figura 7 estão mostrados os cromatogramas para as extrações em arroz em função do meio extrator utilizando extração convencional. Uma vez que o comportamento foi o mesmo para todos os sistemas de extração utilizados, os resultados para MAE e UAE não estão mostrados, optando-se por mostrar apenas os resultados para um sistema de extração.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS para espécies de As em arroz utilizando HNO₃ e H₂O como solução extratora e extração convencional.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 21 min com (NH₄)H₂PO₄ 8,0 mmol L⁻¹ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Os extratos de arroz foram diluídos (em um fator de 2 vezes) na própria fase móvel e, como mostrado na Figura 7, para todas as soluções extratoras avaliadas, foi observada a presença das espécies As(III) e DMA, enquanto que quando utilizadas concentrações mais altas de HNO₃ (por exemplo 1,0 mol L⁻¹) também foi observado um pequeno sinal de As(V) para algumas replicatas (cromatogramas não mostrados). Quanto à eficiência de extração, houve variação de 49 a 80% quando utilizada H₂O e de 94 a 96% quando utilizado HNO₃ 1,0 mol L⁻¹.

Tendo em vista esses resultados, a presença de As(V), apenas para algumas replicatas e quando utilizada a solução ácida, pode ser justificada pela maior eficiência de extração proporcionada por essa solução ou por conversão de espécie na amostra combinada à relação de equilíbrio entre as espécies de As(III) e As(V), conforme o meio. Nesse sentido, foram necessários estudos utilizando soluções de referência de cada espécie, as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos e condições de extração que as amostras, avaliando os efeitos causados por cada meio. Na hipótese de o HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ não contribuir para a conversão das espécies de As, essa solução extratora seria a mais adequada para obtenção de extrações quantitativas de espécies de As para a amostra de arroz, o que não ocorreu para o mesmo ácido em concentrações mais baixas, como será discutido no item 5.4.2.4.

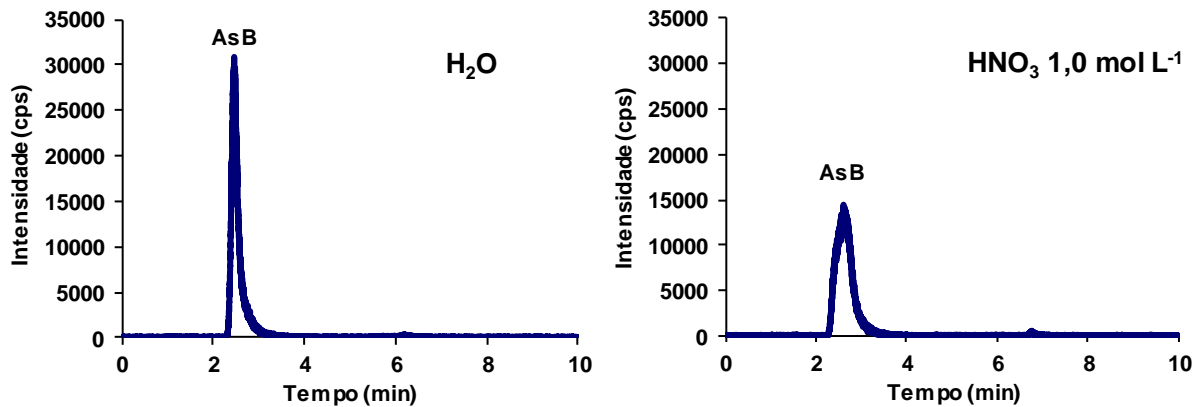
5.4.2.3 Avaliação da estabilidade de espécies de As em peixe em função da concentração de HNO₃

A estabilidade das espécies de As presentes no peixe também foi avaliada após a extração com HNO₃ e H₂O. No caso do peixe, como os ensaios feitos com alga e arroz forneceram indícios para o comportamento das espécies de As, como a conversão da espécie UK1 em concentração mais elevada de HNO₃, optou-se por fazer um ensaio apenas com a solução mais concentrada de HNO₃ (1,0 mol L⁻¹) e H₂O.

Para a análise dos extratos da amostra de peixe foi utilizada a coluna de troca catiônica e as condições descritas no item 5.3. Nesse caso, o extrato da amostra foi diluído (50 vezes) em água, pois não foi observado *drift* na linha base do cromatograma, onde foi identificado um pico com t_R correspondente a AsB (2,45 min). É importante destacar que, apesar da diferença na intensidade (em altura) dos

sinais para as extrações feitas com H_2O e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, os sinais possuem área bastante similar, pois os extratos em ácido apresentaram perfil mais alargado. Corroborando com essa informação, as eficiências de extração, para ambas as soluções extratoras, variaram entre 101 e 107%, mostrando que apesar da diferença no perfil dos cromatogramas, todo o As foi extraído nessas condições. Os cromatogramas para esse experimento estão mostrados na Figura 8.

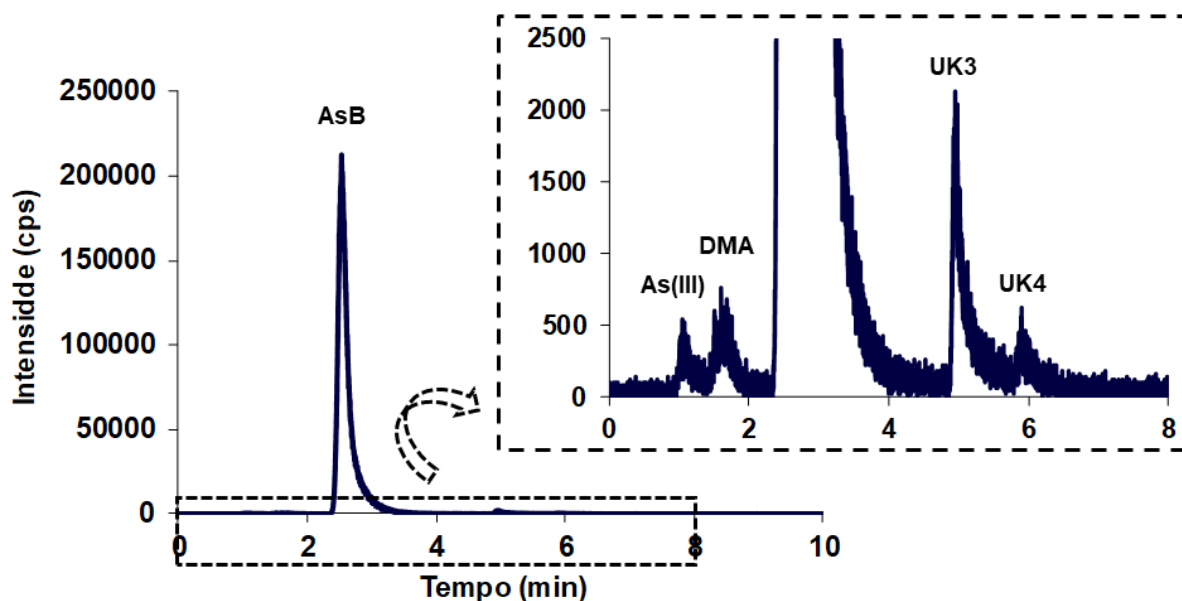
Figura 8 - Cromatogramas obtidos para LC-ICP-MS para espécies de As extraídas de peixe utilizando HNO_3 e H_2O como soluções extratoras e UAE - banho de ultrassom.



Condições de separação: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Como pode ser observado, assim como para o arroz, não foi observada alteração das espécies presentes no peixe, majoritariamente AsB, que não sofreu conversão. Contudo, para algumas replicatas foram observados pequenos picos com tempos de retenção diferentes daquele da AsB. Ao utilizar um fator de diluição menor, foi possível observar que a área desses picos aumentava, sendo possível observar a presença de outras espécies de As [As(III), $t_R = 1,03 \text{ min}$; DMA, $t_R = 1,63 \text{ min}$; UK3, $t_R = 4,65 \text{ min}$; UK4, $t_R = 5,55 \text{ min}$], como mostrado da Figura 9. O aparecimento dessas espécies independe do uso de H_2O ou HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, indicando que são espécies presentes na amostra, e não resultado de conversão.

Figura 9 - Detalhamento do cromatograma obtido por LC-ICP-MS para peixe utilizando o extrato diluído 5 vezes.

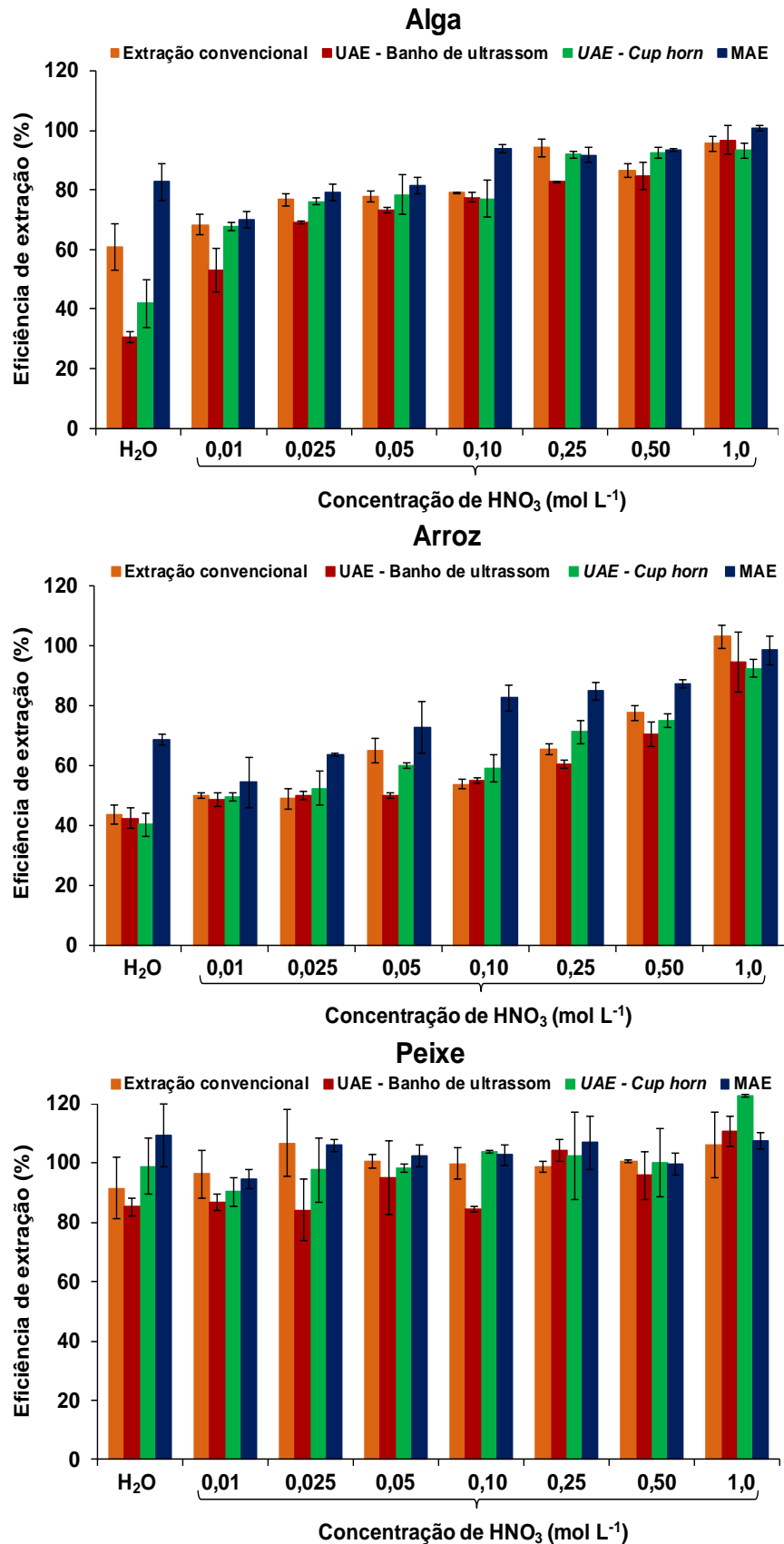


Condições de separação: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

5.4.2.4 Avaliação da concentração do HNO_3 na eficiência de extração de arsênio total

Uma vez que a solução de HNO_3 foi a mais adequada no quesito eficiência de extração, porém não manteve as espécies preservadas, optou-se por fazer uma investigação quanto à concentração dessa solução na eficiência de extração. Dessa forma, visando manter uma boa eficiência de extração e preservar as espécies no extrato, foram investigadas soluções de HNO_3 com concentração de 0,01, 0,025, 0,05, 0,10, 0,25, e $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que os demais parâmetros adotados para a extração não foram alterados. Os resultados estão mostrados na Figura 10 e, para melhor comparação, também está mostrada a eficiência de extração quando utilizados H_2O e $\text{HNO}_3 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 10 - Influência da H₂O e da concentração de HNO₃ na eficiência de extração de As total em alga, arroz e peixe utilizando diferentes métodos de extração.



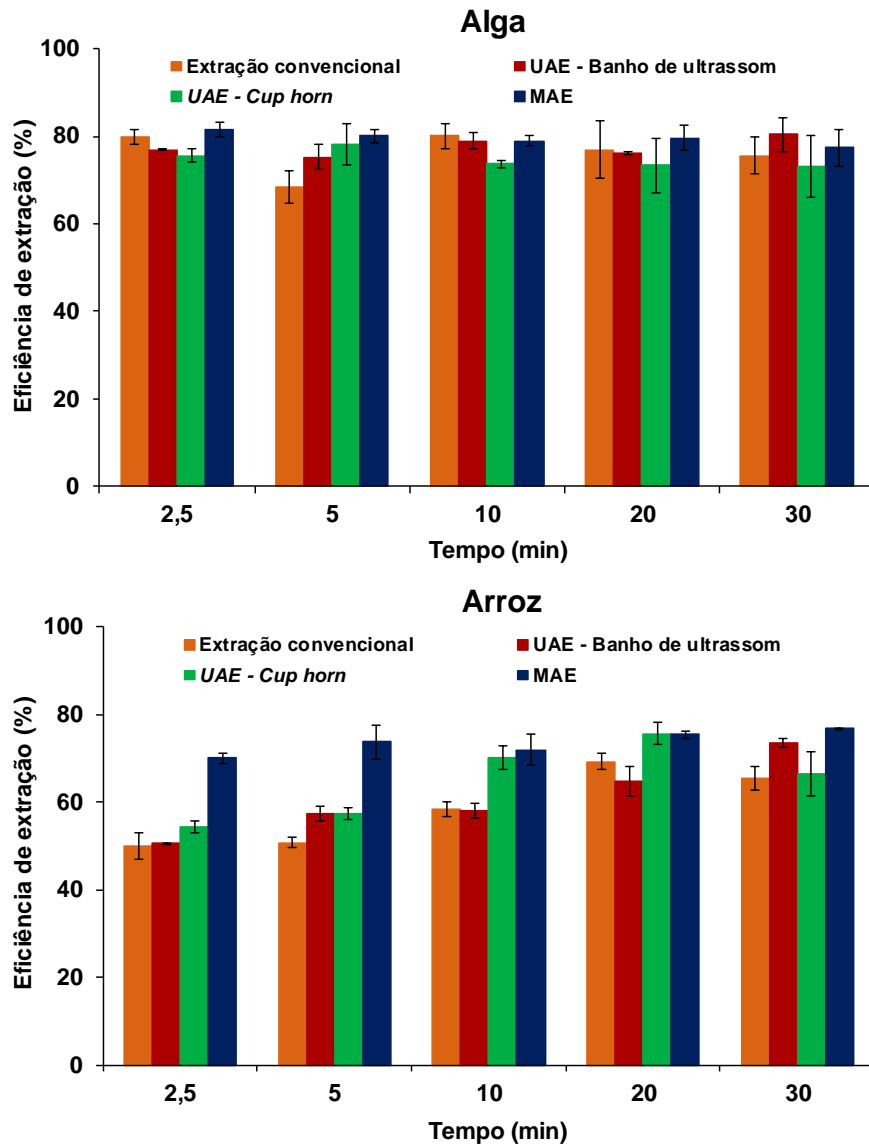
Tanto para a amostra de arroz quanto para a de alga, com o aumento da concentração do ácido ocorreu um aumento na eficiência de extração. No caso do arroz, a eficiência de extração passa de cerca de 42% para 100% quando considerados H_2O e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Para a alga, a diferença na eficiência de extração não foi tão pronunciada para a MAE, contudo para os outros métodos, também foi possível observar que as eficiências de extração foram próximas a 100% apenas para concentrações de HNO_3 acima de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Tendo em vista esses resultados e aqueles discutidos no item 5.4.2.1 para a conversão da espécie UK1 na alga, as soluções escolhidas para a extração de espécies de As foram HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para alga e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para arroz. Essa escolha está relacionada com o fato de apesar da eficiência de extração com a solução de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ não ser próxima a 100% para a alga, ao menos foi observada estabilidade das espécies nessa condição. Por outro lado, para o arroz, como não foi observada alteração na estabilidade das espécies de As, optou-se pela solução extratora que garantisse a máxima eficiência de extração (HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$). No caso da amostra de peixe, foram obtidas eficiências de extração satisfatórias empregando qualquer uma das condições estudadas e, desse modo, H_2O foi escolhida como solução extratora para As em peixe. Quanto ao tempo extração de 2,5 min e temperatura de extração de $75 \text{ }^\circ\text{C}$, ambas foram mantidas para os ensaios seguintes, sem a necessidade de otimização, uma vez que a eficiência de extração para essas condições foi próxima a 100%. Por esse motivo, as avaliações de tempo e temperatura de extração foram feitas e serão discutidas apenas para alga e arroz.

5.4.3 Avaliação do tempo de extração

Visando obter uma maior eficiência de extração utilizando a solução de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, que foi a solução extratora onde não foi observada conversão da espécie UK1, foi feita a avaliação do tempo de extração, o qual vinha sendo de 2,5 min. Contudo, esse ensaio foi feito apenas para alga e arroz, uma vez que para o peixe a eficiência de extração foi próxima a 100% para todas as soluções. A avaliação do tempo de extração para o arroz também foi feita utilizando HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (apesar da melhor condição ser com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$), com o intuito de melhorar a eficiência de extração utilizando solução extratora mais diluída. Nesse

sentido, foram investigados tempos de extração de 2,5, 5, 10, 20 e 30 min e os resultados estão mostrados na Figura 11.

Figura 11 - Influência do tempo de extração na eficiência de extração de As total em alga e arroz utilizando diferentes métodos de extração.



Como pode ser observado, a eficiência de extração para a alga não foi melhorada com a utilização de um maior tempo de extração, sendo que os resultados não apresentaram diferença significativa em um mesmo sistema de extração. Assim, o tempo de 2,5 min foi mantido para a extração de As em alga. Por outro lado, para o arroz, foi observado que com o aumento do tempo de extração, ocorre aumento na eficiência de extração, sendo maior para 20 e 30 min. Como as eficiências de extração para 20 e 30 min não apresentaram diferença significativa

para uma mesma fonte de energia, o tempo de 20 min foi escolhido para ensaios futuros, uma vez que tornaria o procedimento menos moroso.

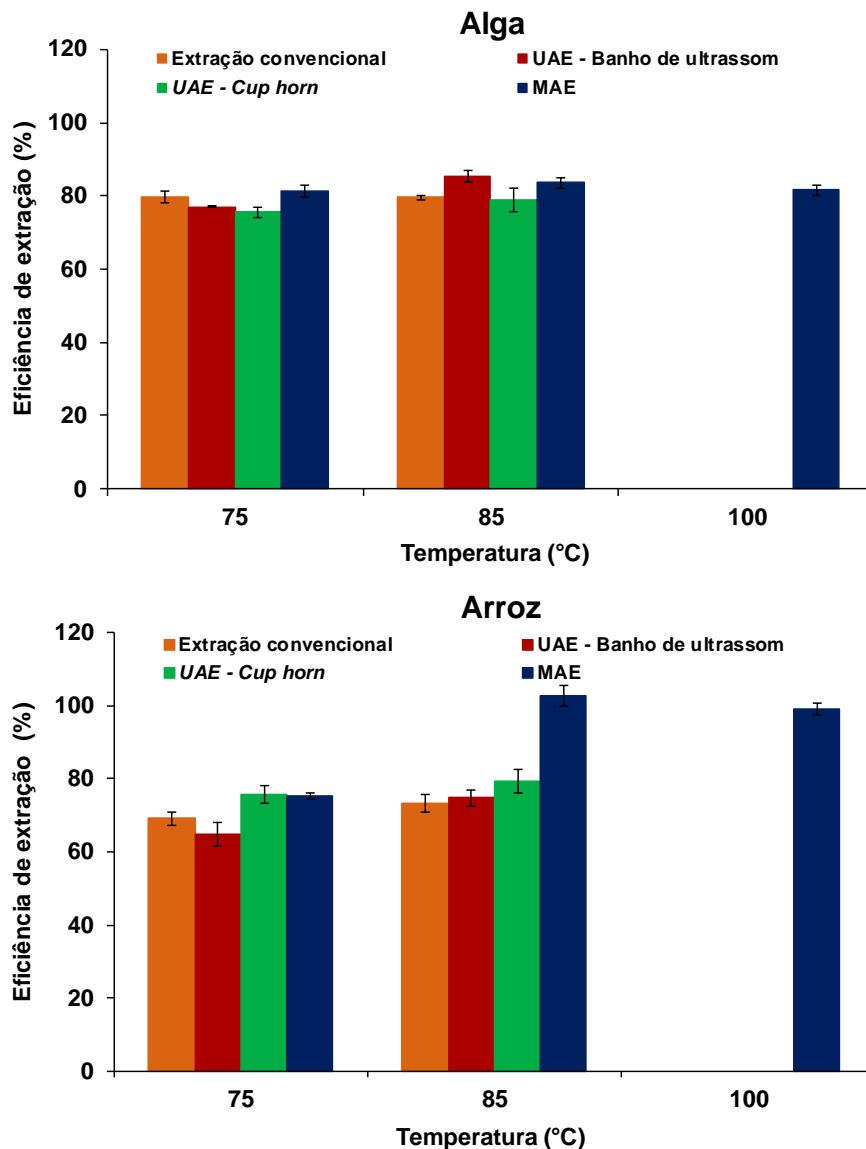
5.4.4 Avaliação da temperatura de extração

Para a avaliação do efeito da temperatura, foram avaliadas as temperaturas de extração de 75 e 85 °C para todos os sistemas, além da temperatura de 100 °C para MAE, uma vez que por limitações instrumentais e práticas não foi possível avaliar essa temperatura para os outros métodos de extração. Não foram avaliadas temperaturas inferiores a 75 °C, temperatura essa que foi utilizada nos experimentos anteriores, pois a eficiência de extração geralmente aumenta com o aumento da temperatura e não com sua diminuição. Novamente, os ensaios para avaliação da influência da temperatura foram feitos apenas para alga e arroz e os resultados estão mostrados na Figura 12.

Assim como observado para o tempo de extração, a temperatura tem mais influência na extração de As do arroz em relação a alga, principalmente quando considerada a aplicação de radiação micro-ondas. Para alga, os resultados praticamente não variaram quando comparadas as eficiências de extração para as duas temperaturas (75 e 85 °C). Esse fato pode estar relacionado com as espécies de As presentes nessas matrizes não serem as mesmas. Enquanto que no arroz estão presentes majoritariamente as espécies As(III), As(V) e DMA, nas algas estão presentes AsSug e/ou AsLip.

Para o arroz, quando considerada a MAE, os valores de eficiência de extração foram concordantes para as temperaturas de 85 e 100 °C, enquanto que a eficiência de extração da MAE a 75 °C foi inferior. Dessa forma, pode-se concluir que as temperaturas de extração de 75 e 85 °C foram as mais adequadas para alga e arroz, respectivamente.

Figura 12 - Influência da temperatura de extração na eficiência de extração de As total em alga e arroz utilizando diferentes métodos de extração.



5.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE DE ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E AMOSTRA

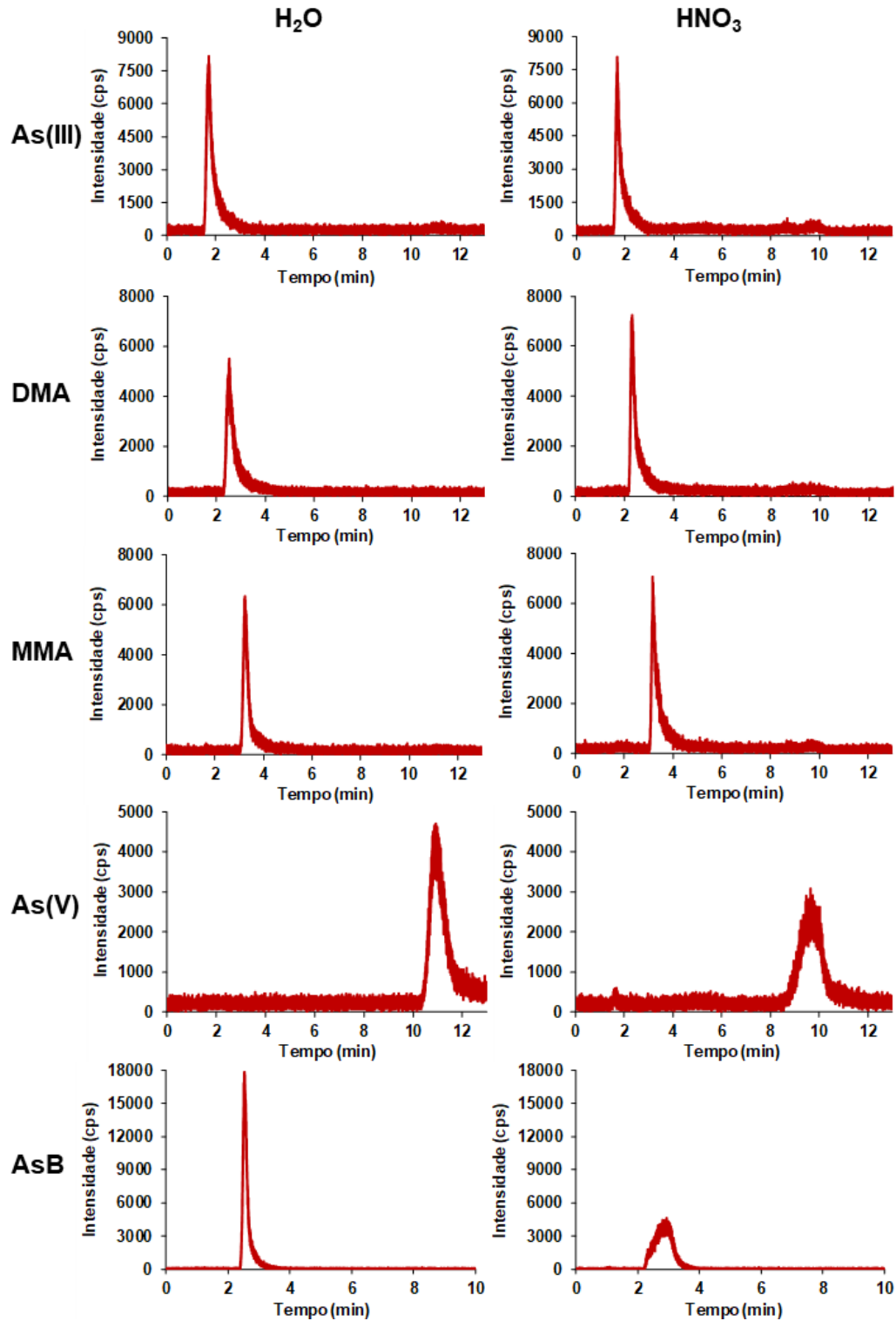
5.5.1 Solução extratora

A fim de avaliar a influência do procedimento de extração, principalmente da solução extratora, bem como do aquecimento na conversão das espécies, foram feitos ensaios para avaliar o comportamento individual das espécies frente ao procedimento de extração na ausência da matriz. Apesar de para alga e peixe terem

sido escolhidas condições de tempo e temperatura de extração inferiores ao que foi escolhido para o arroz, a condição 20 min e 85 °C foi escolhida para esse estudo para proporcionar uma maior exposição das espécies aos efeitos de aquecimento e aplicação de energia estudados. Para essa avaliação foi utilizado o método UAE - banho de ultrassom.

Para esses ensaios, foi feita a adição de uma quantidade conhecida da espécie para que o extrato tivesse a concentração final de 25 µg L⁻¹ de cada espécie [As(III), DMA, MMA, As(V) e AsB]. Essa concentração permitiu uma diluição de 5 vezes para a medição por LC-ICP-MS, uma vez que a diluição foi necessária para que não ocorresse o *drift* na linha base, quando utilizada a coluna de troca aniônica e (NH₄)H₂PO₄, como fase móvel. A comparação dos efeitos foi feita com a utilização de H₂O e HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ como soluções extratoras. Os cromatogramas estão mostrados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Figura 13 - Avaliação da influência da solução extratora (H_2O e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) na estabilidade das espécies As(III), DMA, MMA, As(V) e AsB em solução e referência ($25 \mu\text{g L}^{-1}$ de As para cada espécie).



Condições de separação para As(III), DMA, MMA e As(V): Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.
 Condições de separação para AsB: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Não foram observadas mudanças quanto à conversão das espécies estudadas, contudo foram observadas alterações no t_R conforme a solução extratora utilizada. Adicionalmente, também é possível observar que os sinais para As(V) e AsB também foram mais alargados, enquanto para as outras espécies [As(III), DMA e MMA] não foram notadas diferenças nesse aspecto. Sobre essas alterações no t_R das espécies, foram observados dois comportamentos em função do tipo de coluna e da solução extratora utilizada. Para a coluna de troca aniônica foi possível observar que, quando utilizado HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ como solução extratora, o t_R das espécies diminuiu, se comparado com o t_R quando utilizada H_2O como solução extratora. Por outro lado, para a coluna de troca catiônica, foi possível observar que o t_R para a espécie de AsB foi menor para os extratos em H_2O , sendo de 0,3 a 0,5 min inferiores àqueles obtidos com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os tempos de retenção para cada espécie e solução extratora estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Variação do tempo de retenção das espécies de As em função da solução extratora utilizada.

| Espécie | Tempo de retenção (min) | |
|---------|-------------------------|---|
| | H_2O | HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ |
| As(III) | 1,71 | 1,66 |
| DMA | 2,50 | 2,30 |
| MMA | 3,27 - 3,50 | 3,00 - 3,11 |
| As(V) | 11,0 - 11,10 | 9,70 - 9,80 |
| AsB | 2,53 | 2,86 - 3,00 |

Condições de separação para As(III), DMA, MMA e As(V): Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

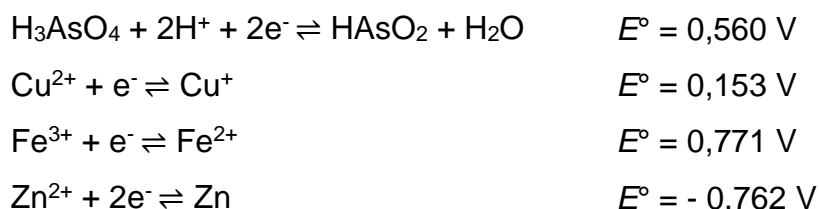
Condições de separação para AsB: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Além dos ensaios descritos anteriormente, foram feitos ensaios para as espécies As(III), DMA, MMA, As(V) e AsB utilizando outras combinações de frequência e de amplitude, sendo aplicadas as amplitudes de 30, 60 e 100% e frequências de 35 e 135 kHz, para UAE - banho de ultrassom. Nesses experimentos, observou-se o mesmo tipo de comportamento, uma vez sendo possível inferir que a alteração do t_R estava associada a concentração da solução extratora, mesmo após a diluição. Tendo em vista que nesses experimentos não foram observadas

conversões das espécies em decorrência das alterações nas condições utilizadas e que o comportamento para todas as espécies foram similares aos apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, os resultados dos experimentos adicionais não estão mostrados.

5.5.2 Efeito da adição de íons Cu, Fe e Zn

Tendo em vista que os constituintes da matriz poderiam acelerar algumas reações como, por exemplo, de oxirredução, foram avaliadas as condições onde soluções contendo os íons foram adicionados aos extratos para observar esse efeito. Os íons Cu, Fe e Zn foram escolhidos em função de estarem presentes em concentração relativamente alta nas amostras, bem como o potencial redox desses íons, quando considerada a semirreação para As.⁶² Contudo, puderam ser consideradas apenas as espécies iAs, uma vez que não foram encontradas semirreações com potencial redox para as espécies oAs. Abaixo estão mostradas as semirreações para As⁵⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ e Zn²⁺, e seus respectivos potenciais padrão de redução (E°) a 25 °C e 1 atm.



5.5.2.1 Adição de íons à solução de referência das espécies de As

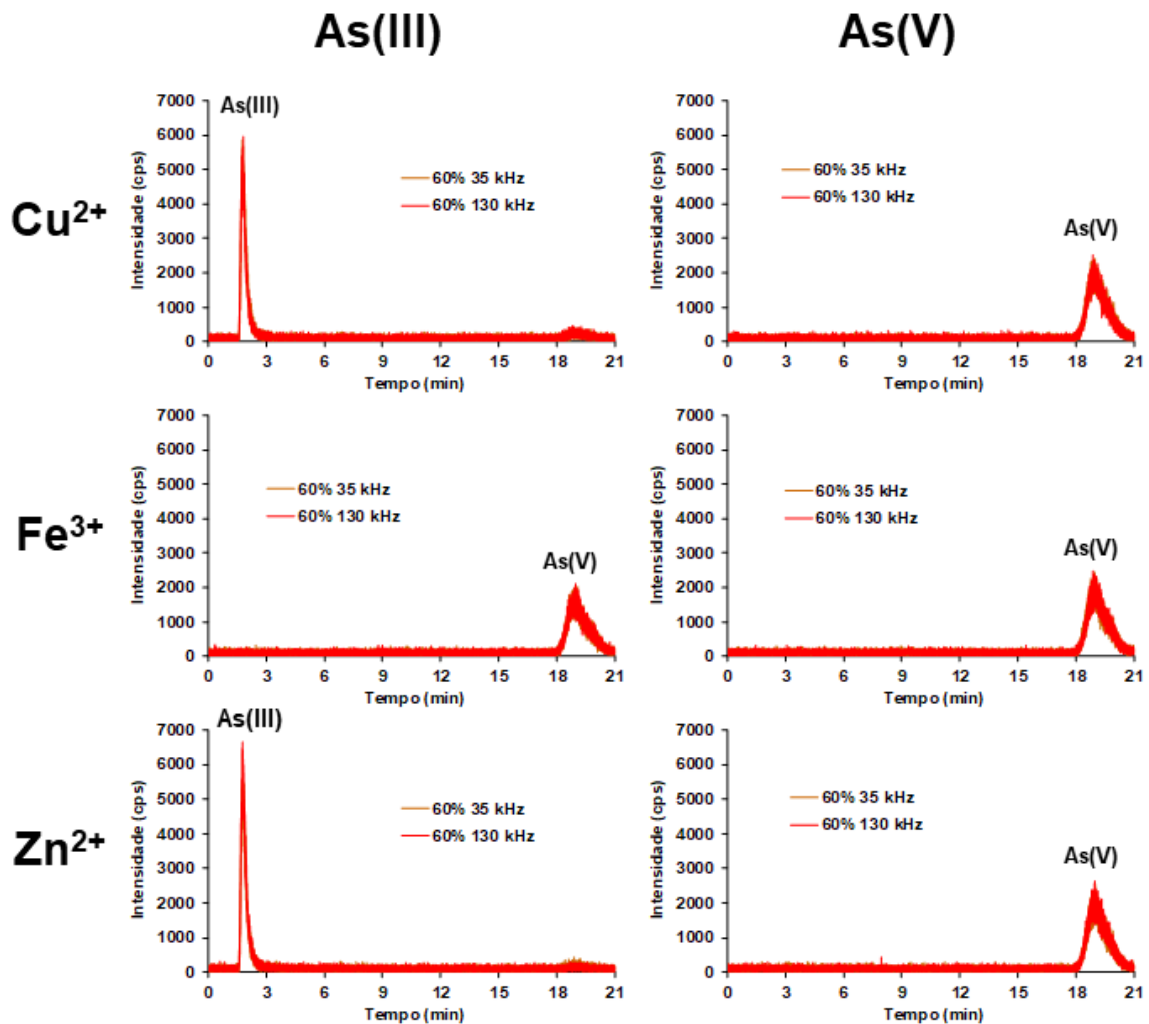
Considerando-se o potencial de oxirredução das semirreações dos Cu²⁺, Fe³⁺ e Zn²⁺ e das espécies iAs, esses íons foram escolhidos para os ensaios. Para isso, eles foram adicionados separadamente às soluções contendo cada uma das espécies iAs, na concentração de 25 µg L⁻¹, para permitir uma diluição adequada na etapa de determinação por LC-ICP-MS. Esses ensaios foram feitos utilizando HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ como solução extratora, uma vez que algumas semirreações necessitam de meio ácido para ocorrerem, utilizando-se os mesmos procedimentos empregados para as extrações de As nas amostras. Os íons foram adicionados para

que a concentração final dos mesmos fosse de 10 mg L^{-1} no extrato avolumado a 25 mL.

Os ensaios foram feitos utilizando o UAE - banho de ultrassom, sendo que esse método de extração foi utilizado para que pudessem ser avaliadas mudanças na amplitude e na frequência utilizadas. Logo, nesses ensaios de adição de soluções contendo os íons em solução de referência de espécie de As, além da condição inicial de 35 kHz e 60% de amplitude, foram feitos experimentos utilizando a frequência de 130 kHz e 60% de amplitude. Na Figura 14 estão mostrados os cromatogramas referentes a esse experimento.

Como pode ser observado, quando da presença de Fe^{3+} ocorreu a conversão da espécie de As(III) para a espécies de As(V). Esse fato pode ser explicado quando são consideradas as semirreações de oxirredução, enquanto o potencial de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} é 0,771 V, o potencial para a oxidação de As^{3+} para As^{5+} é de -0,560 V. Dessa forma, pode-se inferir que esta reação seja favorecida nas condições de extração quando o Fe^{3+} está presente no meio em altas concentrações, na ordem de 10 mg L^{-1} . Devido ao fato de Cu^{2+} e Zn^{2+} não causarem o mesmo efeito de conversão, apenas Fe^{3+} foi escolhido para novos ensaios acerca de sua influência na conversão de espécies de As.

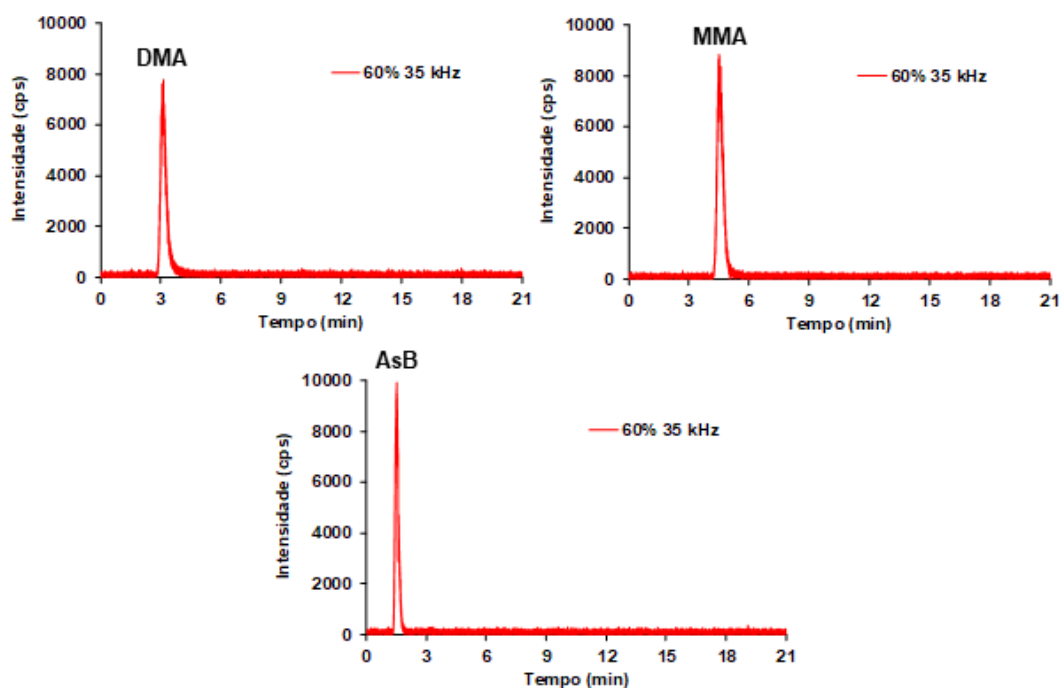
Figura 14 - Cromatogramas obtidos para espécies iAs após procedimento de extração na presença de Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} .



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 21 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Como foi observada a conversão de As(III) na presença de Fe^{3+} , também foram feitos ensaios para as espécies DMA, MMA e AsB utilizando solução de referência e nas condições descritas para As(III) e As(V) . Os resultados estão mostrados na Figura 15, onde é possível observar que mesmo na presença de 10 mg L^{-1} de Fe^{3+} , essas três espécies permanecem estáveis, não sendo observada conversão.

Figura 15 -Cromatogramas obtidos para espécies DMA, MMA e AsB após procedimento de extração na presença de Fe^{3+} .



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 21 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 8,0 mmol L^{-1} (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

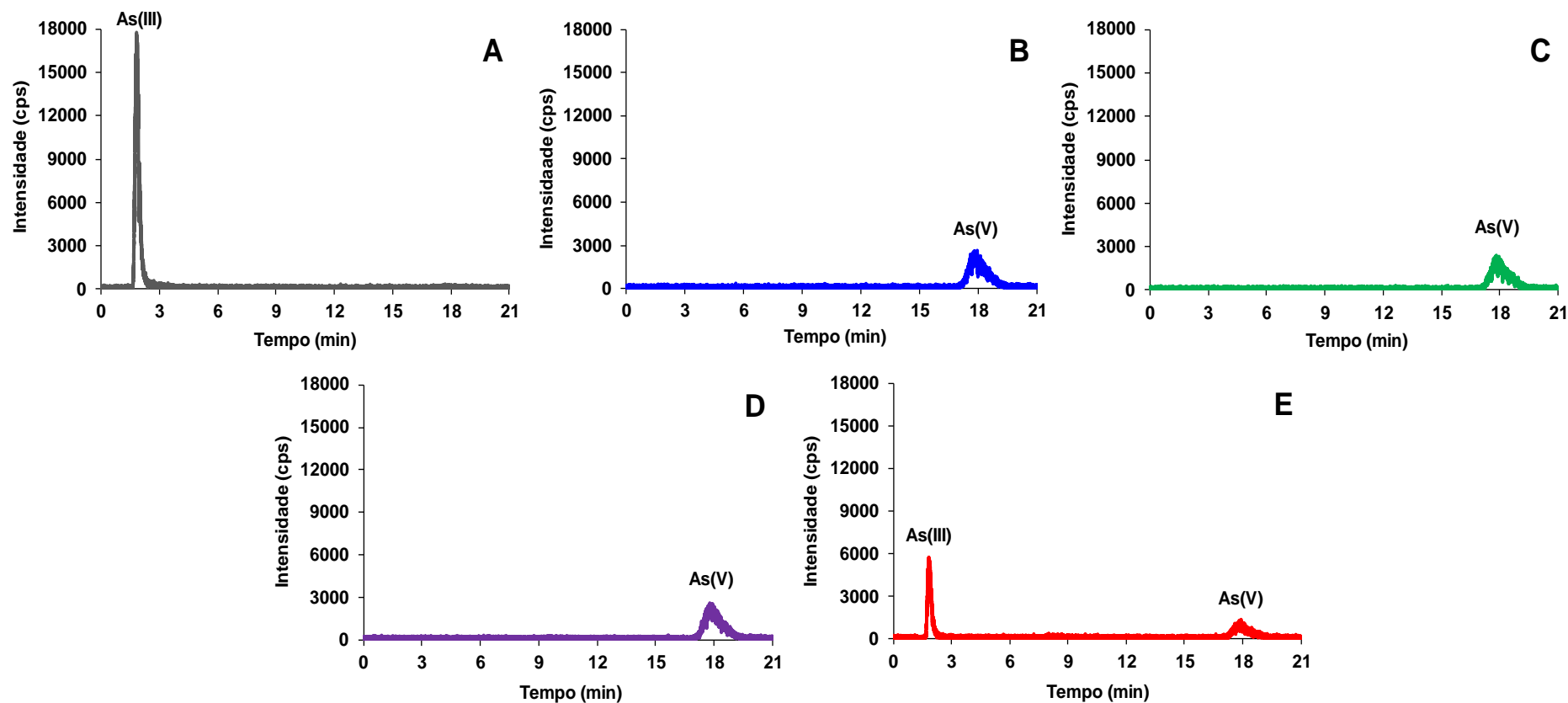
5.5.2.2 Efeito da adição de Fe^{3+} na conversão de As(III) em solução de referência e nas amostras

Tendo em vista que foi observada apenas a conversão da espécie de As(III) na presença de Fe^{3+} , foram investigados quais efeitos poderiam contribuir para essa conversão, como a solução extratora (H_2O e HNO_3 0,01 mol L^{-1}) e o aquecimento até 85 °C. Dessa maneira, foram feitos ensaios com a solução de As(III) com adição de Fe^{3+} , onde foram utilizadas como soluções extradoras H_2O e HNO_3 0,01 mol L^{-1} , aquecimento simulando aquele ao qual as amostras são submetidas previamente a etapa de extração, a etapa de UAE - banho de ultrassom propriamente dita e condições sem aquecimento.

Como pode ser observado na Figura 16, a espécie As(III) permanece preservada no procedimento de UAE - banho de ultrassom, mesmo utilizando meio ácido (ensaio A). Todavia, quando da presença de Fe^{3+} ocorre a conversão total da

espécie As(III), independentemente da solução utilizada, bem como do meio (ou ausência) de aquecimento utilizado (ensaios B, C e D da Figura 16). Por outro lado, quando a solução extratora utilizada foi H₂O e não foi feito aquecimento, pode-se observar que a conversão da espécie As(III) para As(V) ocorreu de forma parcial. Com isso, pode ser concluído que tanto o meio ácido, quanto o aquecimento, contribuem para que a conversão de As(III) para As(V) ocorra, pois quando foi utilizada H₂O como solução extratora com aquecimento (condição C) e quando utilizado HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ sem aquecimento (condição D), ocorreu conversão total da espécie de As(III) para As(V) na presença de Fe³⁺.

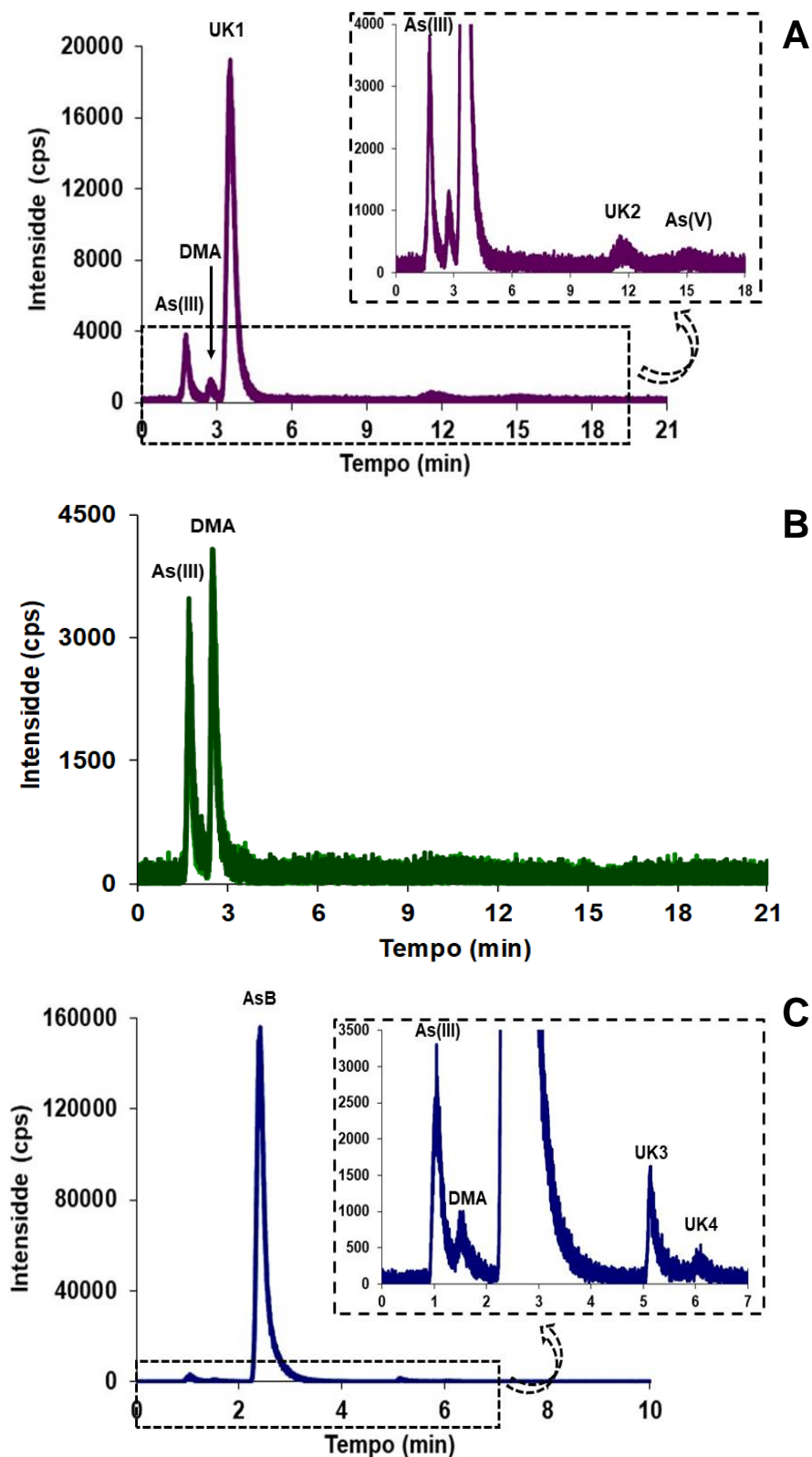
Figura 16 - Cromatogramas obtidos na avaliação do efeito da adição de Fe^{3+} em solução de referência. (A) As(III) sem adição de Fe^{3+} , extração com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e submetido ao procedimento de UAE - banho de ultrassom; (B) As(III) com adição de Fe^{3+} , extração com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e submetido apenas a aquecimento até 85°C por 10 min; (C) As(III) com adição de Fe^{3+} , extração com H_2O e submetido ao procedimento de UAE - banho de ultrassom; (D) As(III) com adição de Fe^{3+} , extração com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e sem aquecimento; (E) As(III) com adição de Fe^{3+} , extração com H_2O e sem aquecimento.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 21 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Como a espécie As(III) está presente em baixas concentrações nas amostras, foi feito um enriquecimento das mesmas com solução de referência dessa espécie ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) a fim de avaliar se a concentração de Fe nas amostras poderia acarretar a conversão de As(III) para As(V). A quantidade de Fe extraída da matriz nas condições otimizadas de extração para cada amostra é de cerca de 20% para alga e peixe e de 87% para arroz da concentração de Fe original nas amostras (Tabela 6). Essa quantidade de Fe extraída das amostras corresponde a concentração no extrato de $0,33$, $0,09$ e $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para alga, arroz e peixe, respectivamente. Os ensaios foram feitos utilizando UAE - banho de ultrassom e as condições otimizadas para cada amostra. Os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 17 e é possível observar que o As(III) adicionado não foi convertido em nenhuma das amostras, indicando que a concentração de Fe presente naturalmente nas amostras não influencia na conversão dessa espécie ou não é extraído da amostra em quantidade suficiente para promover a conversão.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos para (A) alga, (B) arroz e (C) peixe enriquecidos com $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) após UAE - banho de ultrassom.



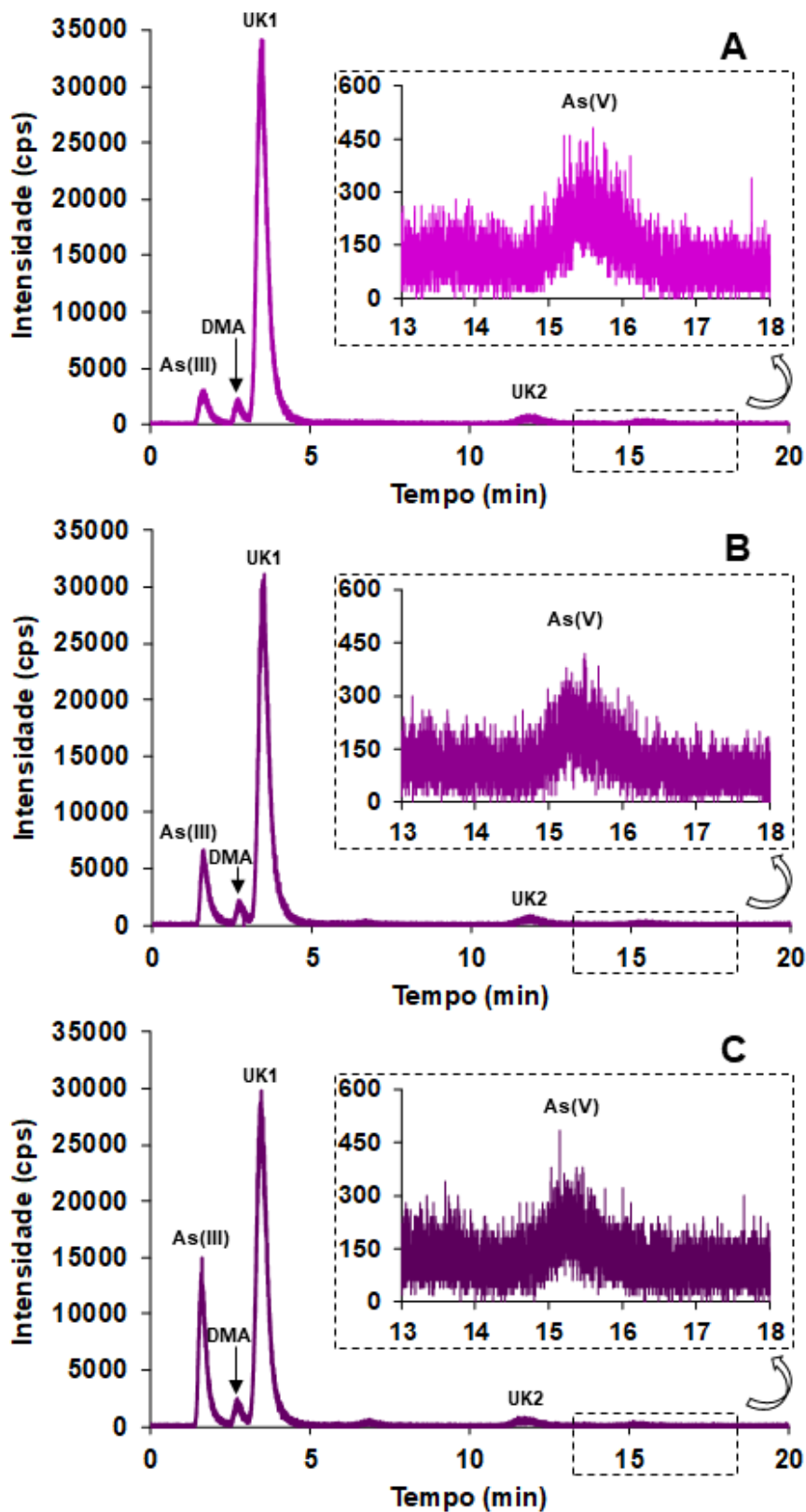
Condições de separação para alga e arroz: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 13 min com $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.
 Condições de separação para peixe: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Uma vez que a concentração de Fe presente na amostra não causou a conversão das espécies de As(III), foram feitos ensaios onde foram adicionadas concentrações de Fe³⁺ em três níveis (2, 5 e 10 vezes) em relação àquela existente em cada uma das amostras. Para isso, foi calculada qual seria a concentração de Fe (com base nos resultados mostrados na Tabela 6) que deveria ser adicionada considerando a extração utilizando 200 mg de amostra e aferição a 25 mL. Assim, os extratos tiveram concentrações de Fe³⁺ adicionadas de 3,2, 8,2 e 16,4 mg L⁻¹ para a alga, 0,2, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ para o arroz e 0,19, 0,47 e 0,94 mg L⁻¹ para o peixe. Cabe mencionar que nessas concentrações não estão considerados os valores da concentração de Fe presente naturalmente na amostra, uma vez que esse elemento não é totalmente extraído utilizando a condição otimizada e não é conhecido o estado de oxidação em que está presente na amostra. Esses experimentos foram feitos como descrito no item 4.8.2.3, sendo utilizada a UAE - banho de ultrassom e as condições otimizadas para cada amostra.

Como pode ser observado para a alga (Figura 18), com o aumento da concentração de Fe³⁺, também ocorre um aumento na área da espécie As(III) e uma diminuição na área da espécie UK1, bem como pode ser notado um pequeno sinal para a espécie As(V). Ou seja, além de causar oxidação na espécie As(III), o Fe³⁺ também influencia na conversão da espécie UK1 presente na alga. Uma vez que não é conhecida a estrutura dessa espécie, é difícil prever a forma como a adição de Fe³⁺ pode reagir com a espécie UK1, ou propor uma reação que explique essa conversão.

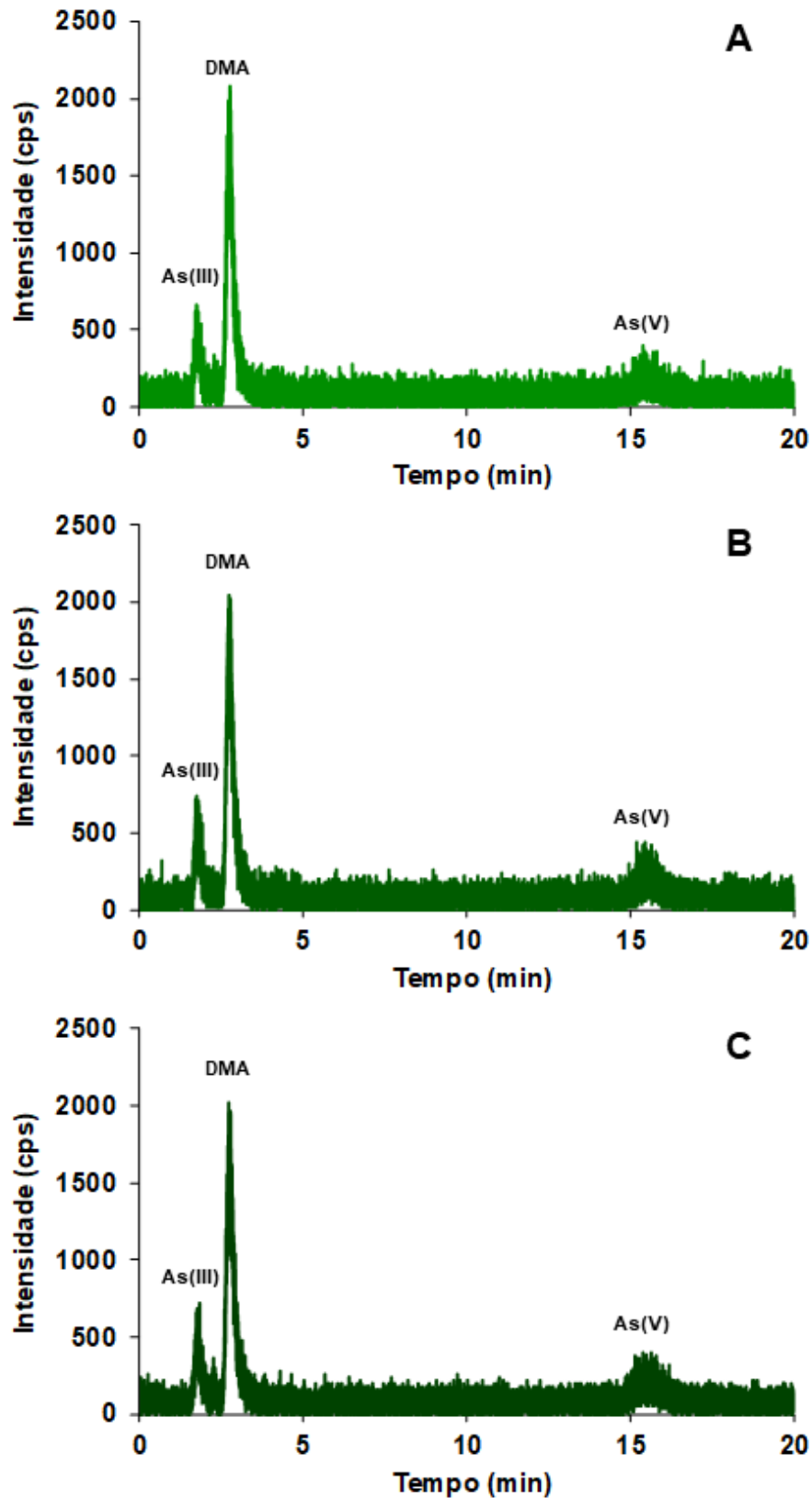
No caso do arroz, foi possível observar o aparecimento do sinal para o As(V) nos cromatogramas (Figura 19). O fato de não ocorrer conversão de espécies [ou aparecimento de As(V)] nos outros ensaios utilizando a amostra de arroz pode *i)* estar associado tanto à concentração de Fe naturalmente presente na amostra não ser suficiente para promover esse efeito; *ii)* pelo Fe estar presente na amostra em outro estado de oxidação (Fe²⁺, por exemplo) ou *iii)* o Fe estar ligado à matriz, estando indisponível para reações com as espécies de As. Para o peixe, não foram observadas variações no comportamento das espécies, como está mostrado na Figura 20.

Figura 18 - Espécies de As em alga após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 3,2, (B) 8,2 e (C) 16,4 mg L⁻¹ de Fe³⁺ no extrato.



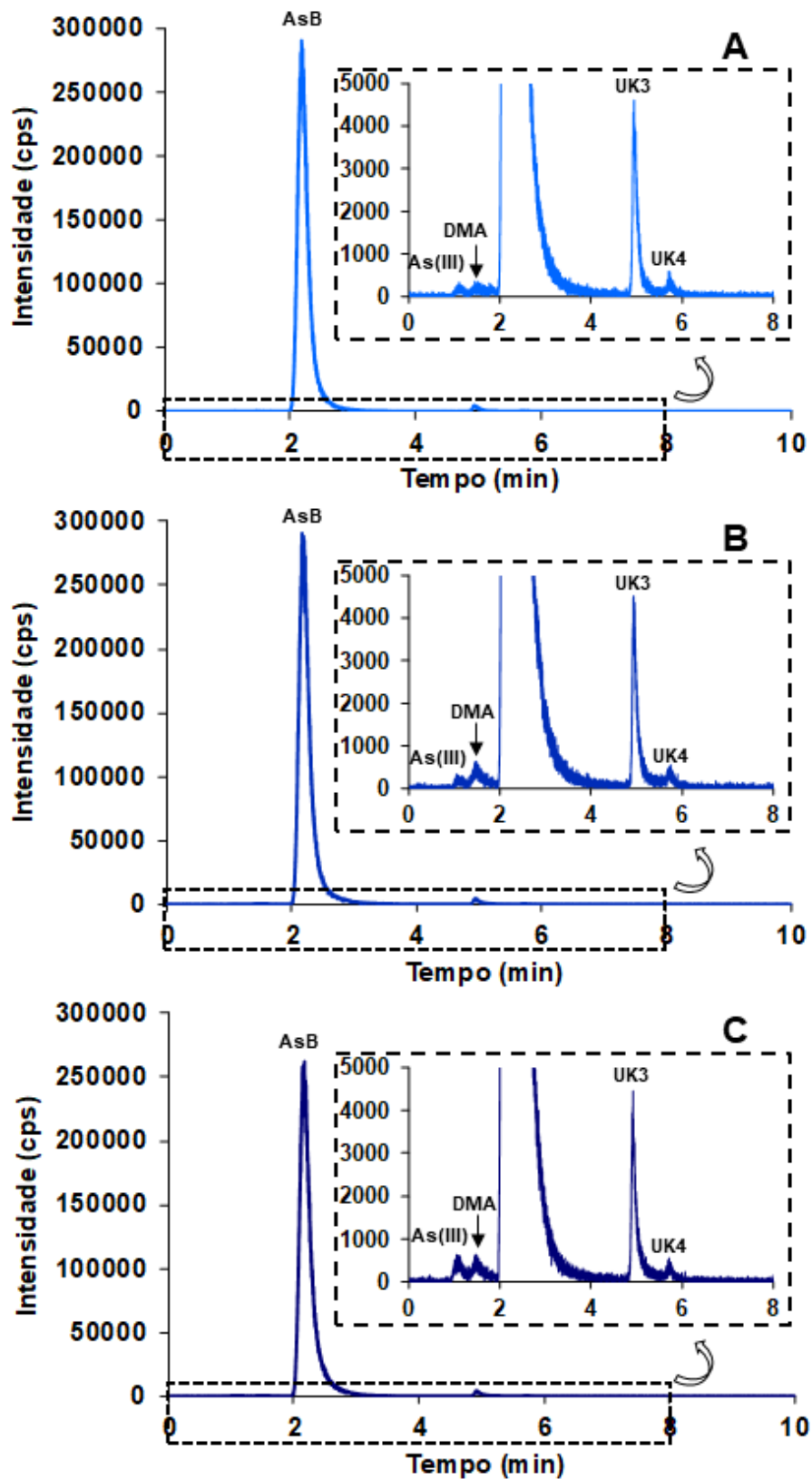
Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 20 min com (NH₄)H₂PO₄ 8,0 mmol L⁻¹ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Figura 19 - Espécies de As em arroz após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 0,2, (B) 0,5 e (C) 1,0 mg L⁻¹ de Fe³⁺ no extrato.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 20 min com (NH₄)H₂PO₄ 8,0 mmol L⁻¹ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Figura 20 - Espécies de As em peixe após UAE - banho de ultrassom com adição de (A) 0,19, (B) 0,47 e (C) 0,94 mg L⁻¹ de Fe³⁺ no extrato.

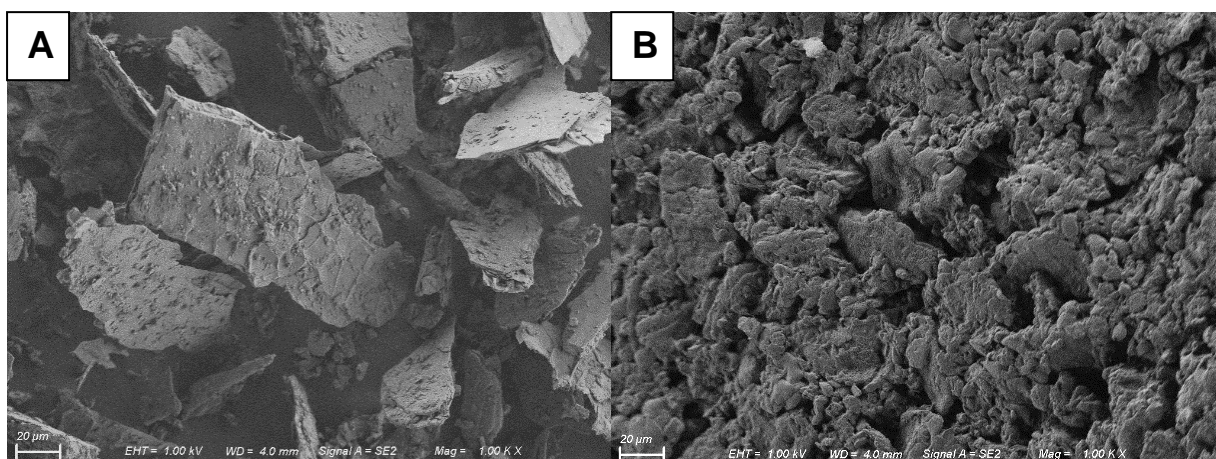


Condições de separação: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina 2,0 mmol L⁻¹ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

5.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras de alga, arroz e peixe foram caracterizadas por MEV para a avaliação morfológica do material antes e após as extrações, uma vez que alterações da superfície da amostra poderiam auxiliar na discussão dos efeitos da eficiência de extração. Na Figura 21 está mostrada a imagem da superfície da amostra de alga antes e depois da extração por UAE - banho de ultrassom, em condições otimizadas. Como pode ser observado, antes do procedimento de extração, a superfície da amostra possuía estruturas retangulares bem definidas em diversos pontos, apresentando ângulo reto e com algumas estruturas menores e indefinidas sobre esses retângulos. Após a extração, o sólido perdeu esse aspecto definido, passando a ter o aspecto de pequenas esferas irregulares definidas, embora em alguns pontos seja possível observar resquícios das formas angulares presentes anteriormente. A modificação da morfologia da amostra pode estar associada tanto com o ataque pela solução ácida, quanto aos fenômenos de cavitação que ocorreram no processo de UAE, gerando uma maior desordem na estrutura.

Figura 21 - Aspecto da superfície da amostra de alga (A) antes e (B) após o procedimento de extração empregando UAE - banho de ultrassom.

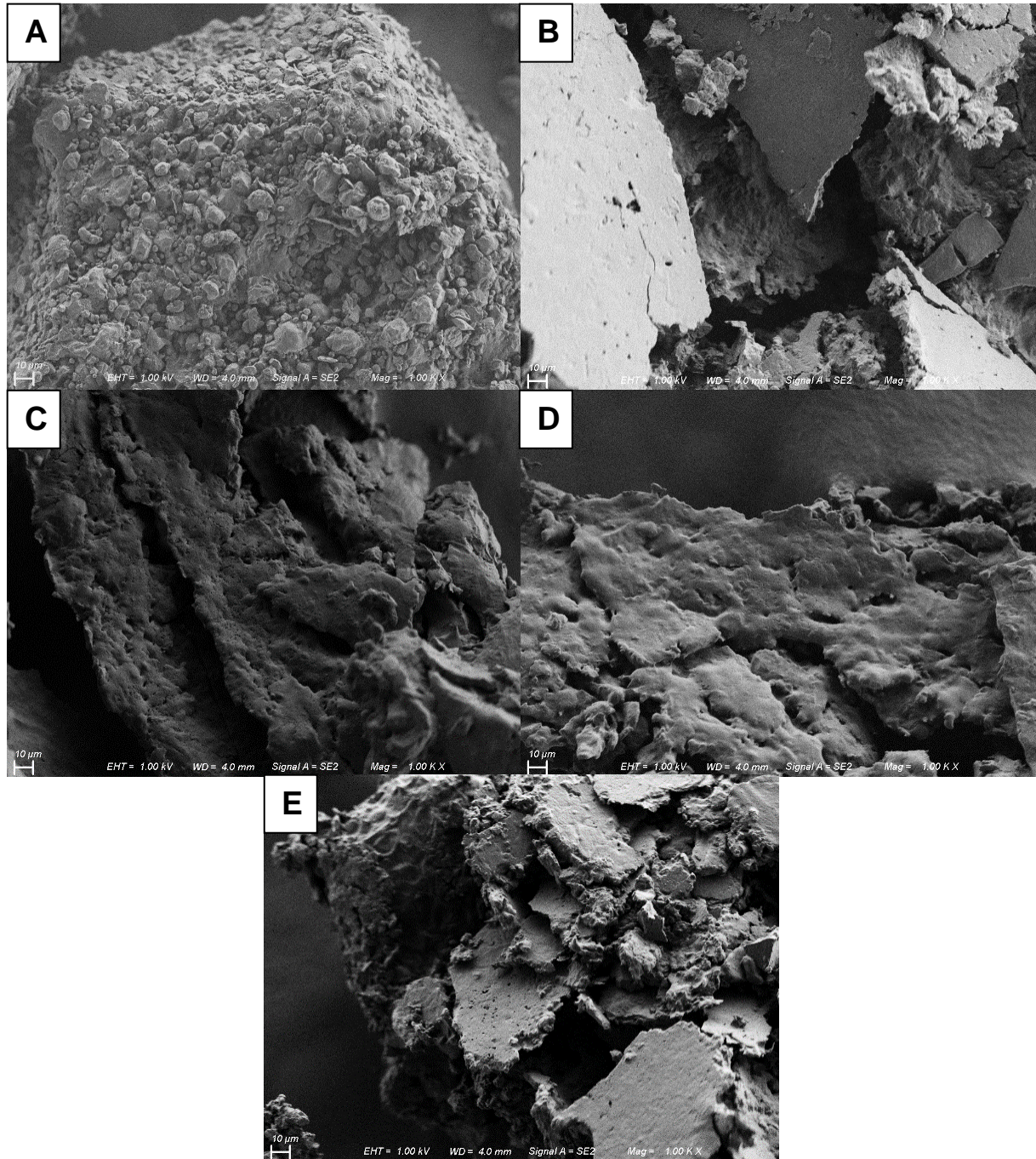


Para a amostra de arroz foi possível a obtenção das imagens para todos os procedimentos de extração, como mostrado na Figura 22. É possível perceber que ocorreram mudanças na morfologia em todas as amostras, contudo a mudança no aspecto é mais significativa naquelas amostras submetidas à UAE, tanto em banho

de ultrassom quanto *cup horn*. Nessas amostras é possível observar que o padrão de esferas e formas indefinidas quase desaparece, restando um aspecto de superfície mais liso (sem esferas na superfície). Por outro lado, quando utilizada a agitação mecânica ou micro-ondas, o aspecto da superfície preserva algumas características da amostra antes do procedimento de extração, como algumas estruturas ou formas de ângulo reto, porém as estruturas mais arredondadas também não são observadas.

Nesse sentido, como a solução extratora utilizada (HNO_3 1 mol L^{-1}) foi a mesma para todas as fontes de energia, pode-se concluir que os fenômenos relacionados ao ultrassom, como cavitação, acabaram por gerar modificações na estrutura morfológica da amostra. Todavia, como a eficiência de extração para o arroz foi próxima a 100% para todos os métodos de extração, pode-se inferir que, para essa aplicação e amostra, a alteração da superfície e possível melhor homogeneização quando utilizada a UAE, não foi fator preponderante para melhorar a eficiência de extração.

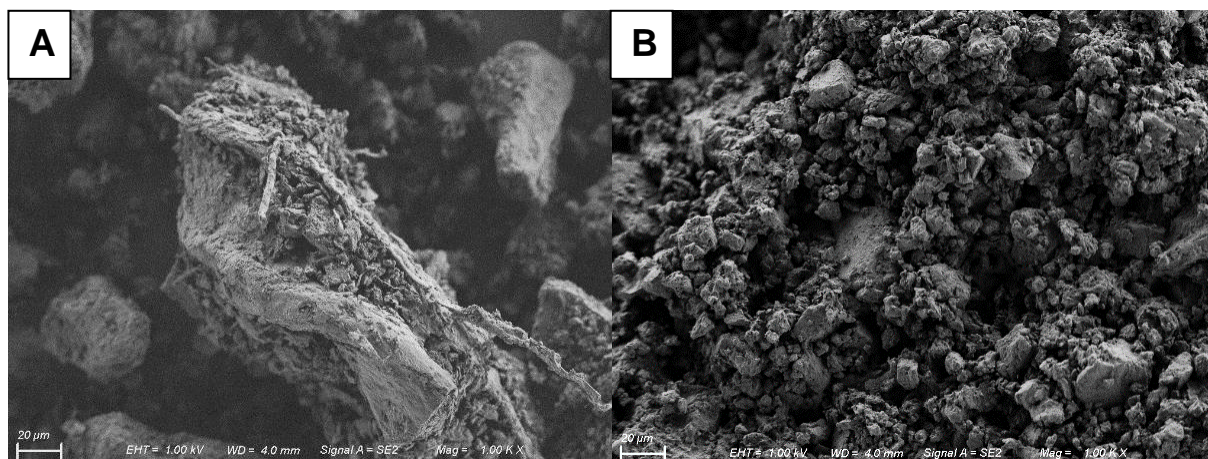
Figura 22 - Aspecto da superfície da amostra de arroz (A) antes e após o procedimento de extração empregando (B) agitação mecânica, (C) banho de ultrassom, (D) *cup horn* e (E) micro-ondas para extração.



Como discutido para as amostras de alga e arroz, para o peixe também foi feita a comparação da morfologia antes e após a extração. Pode-se observar alterações na estrutura da amostra (Figura 23). Antes da extração havia diferentes padrões na morfologia da amostra, com estruturas de diferentes formas e tamanhos. Após o procedimento de extração por UAE - banho de ultrassom foi possível

observar uma maior homogeneidade no tipo de estrutura presente, sendo em sua maioria formas irregulares e indefinidas.

Figura 23 - Aspecto da superfície da amostra de peixe (A) antes e (B) após o procedimento de extração empregando UAE - banho de ultrassom.



5.7 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

5.7.1 Condições estabelecidas para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe

Após os ensaios onde foram avaliados, tanto a preservação das espécies originais presentes nas amostras, quanto os fatores que podem influenciar na conversão durante a extração, foram estabelecidas as condições de compromisso para a quantificação das espécies em cada uma das matrizes. As condições estão resumidas na Tabela 9, sendo que essas condições foram utilizadas para todos os métodos de extração (convencional, MAE e UAE)

Tabela 9 - Condições selecionadas para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe.

| Parâmetro | Condição de extração escolhida por amostra | | |
|-----------------------------------|--|---|------------------|
| | Alga | Arroz | Peixe |
| Massa de amostra (mg)* | 200 | 200 | 200 |
| Tempo de extração (min) | 2,5 | 2,5 ou 20 | 2,5 |
| Temperatura de extração (°C) | 75 | 75 ou 85 | 75 |
| Solução extratora | HNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹ | HNO ₃ 0,01 ou 1,0 mol L ⁻¹ | H ₂ O |
| Volume de solução extratora (mL)* | 10 | 10 | 10 |
| Volume total (mL)* | 25 | 25 | 25 |

*Valores escolhidos sem avaliação.

Para a alga, o fator mais importante para a escolha da melhor condição de extração foi a concentração de HNO₃, uma vez que foram obtidas eficiências de extração próximas a 100% somente em concentrações mais elevadas (HNO₃ 1,0 mol L⁻¹), porém mediante a conversão da espécie UK1 em As(III). Dessa forma, optou-se pelo uso de HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ para a extração, visando preservar a espécie desconhecida de As. Foi observado que nas condições estudadas não ocorreram melhoras na eficiência de extração quando utilizadas temperaturas e tempos de extração superiores, logo condições de temperatura e tempo de extração mais brandas (75 °C e 2,5 min, respectivamente) foram escolhidas. Nestas condições, a eficiência de extração das espécies de As em alga foi de 76%.

Para o arroz, foi observado que a concentração da solução extratora (HNO₃), temperatura e tempo de extração influenciavam na eficiência de extração. Quando utilizados HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, temperatura de extração de 75 °C e tempo de extração de 2,5 min foram obtidas eficiências de extração adequadas. Adicionalmente, também foram obtidas recuperações satisfatórias quando utilizada concentração de HNO₃ de 0,01 mol L⁻¹. Porém, nesse caso, foi necessária a utilização de maior temperatura e tempo de extração (85 °C e 20 min, respectivamente). Nos ensaios feitos para a amostra de arroz, não foram observadas conversões das espécies de As presentes [As(III) e DMA] e foram obtidas eficiências de extração próximas a 100% nas condições utilizadas. Assim como para arroz, para peixe foi observada a estabilidade das espécies presentes na amostra, independente da condição utilizada. Contudo condições mais brandas, como a utilização de H₂O como solução

extratora, 75 °C e 2,5 min de extração, foram suficientes para proporcionar a extração total (cerca de 100%) das espécies de As da matriz.

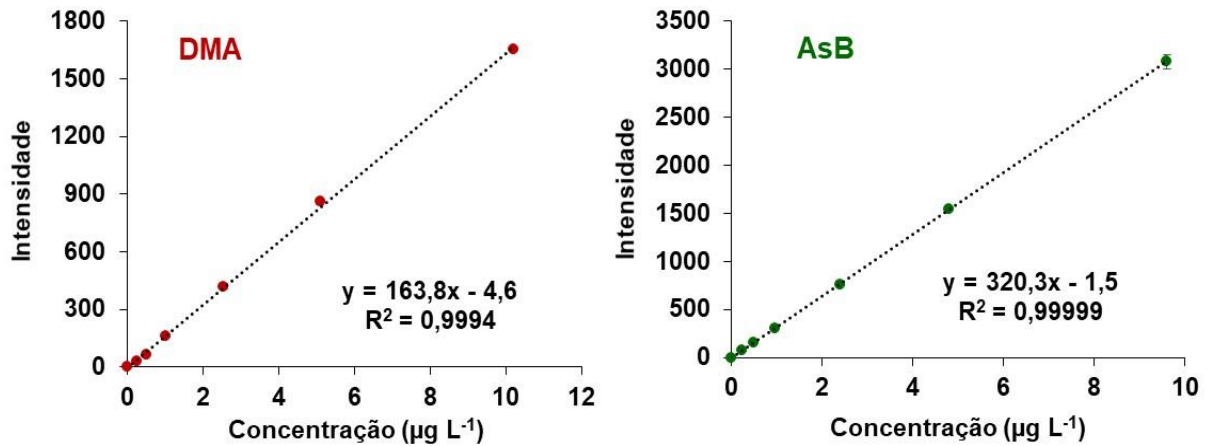
5.7.2 Quantificação das espécies de As em alga, arroz e peixe

Após definidas as condições mais adequadas para a extração e com garantia de estabilidade das espécies de As, foram determinadas as concentrações das espécies de As em cada amostra. As extrações foram feitas usando extração convencional, MAE e UAE (banho de ultrassom e *cup horn*) para as três amostras e todas as espécies presentes foram quantificadas nos extratos. Devido aos baixos valores de desvio padrão para todos os ensaios, os experimentos para a quantificação das espécies de As foram feitos com duas replicatas.

As calibrações para as quantificações das espécies de As nas amostras foram feitas com soluções contendo apenas uma espécie de As, sendo DMA para a calibração utilizando a coluna de troca aniônica e AsB para a calibração utilizando a coluna de troca catiônica. Ambas as curvas de calibração foram feitas utilizando concentrações entre 0,25 e 10 µg L⁻¹, as quais foram feitas em triplicata para cada concentração. Esse tipo de calibração utilizando apenas uma espécie foi possível uma vez que ambos métodos de separação cromatográfica foram feitos no modo isocrático e que o As no plasma fornece a mesma intensidade de sinal, independente da espécie química. Cabe destacar que a curva de calibração para a coluna de troca aniônica foi preparada em fase móvel NH₄H₂PO₄ 5,0 mmol L⁻¹, para evitar o *drift* da linha base, como mencionado anteriormente. As soluções de calibração para a coluna de troca catiônica foram preparadas em água ultrapura por não apresentar o mesmo comportamento de linha base que a coluna de troca aniônica.

Para obtenção da relação entre a concentração e os valores dos sinais para as soluções de referência, foi utilizada área de pico, integrada utilizando o *software* Origin 8. Os picos para as amostras também foram integradas utilizando esse mesmo recurso. Excepcionalmente para os picos relativos ao DMA na amostra de alga, estes foram impressos, recortados, pesados e feita a relação com a concentração, uma vez que o *software* não permitiu uma integração correta em função da resolução inadequada, como será discutido posteriormente. As curvas de calibração estão mostradas na Figura 24.

Figura 24 - Curvas de calibração para as espécies de As por LC-ICP-MS utilizando DMA para coluna de troca aniônica e AsB para coluna de troca catiônica.



A seguir, serão discutidos individualmente os resultados para a quantificação das espécies de As em alga, arroz e peixe. Além desses resultados para a concentração de cada espécie, serão mostrados os resultados para o somatório das espécies quantificadas por LC-ICP-MS em cada amostra, bem como o valor de As total nos extratos e a concentração total de arsênio nas amostras (valores de referência) após a decomposição por MAD e determinação por ICP-MS (como descrito no item 5.2).

Para a quantificação das espécies de As na alga, foram feitas duas diluições do extrato, a primeira delas de 20 vezes, para a quantificação da espécie UK1, presente em maior concentração e uma segunda diluição de 2 vezes para a quantificação das espécies presentes em menor concentração, As(III), DMA e uma espécie desconhecida identificada como UK2. Os resultados para a quantificação de espécies de As na alga estão mostrados na Tabela 10, enquanto os valores de eficiência de extração, recuperação cromatográfica e balanço de massa para as três amostras estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 10 - Quantificação de espécies de As em alga por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ como solução extratora. Resultados expressos em µg g⁻¹ (média ± SD, n = 2).

| Método de extração | Espécies de As (LC-ICP-MS) | | | | | As total |
|--------------------------|----------------------------|---------------|------------|---------------|------------|-----------------|
| | As(III) | DMA | UK1 | UK2 | Σ espécies | Extração/ICP-MS |
| Extração convencional | 0,341 ± 0,060 | 0,307 ± 0,052 | 13,7 ± 0,4 | 0,288 ± 0,039 | 14,6 ± 0,4 | 14,7 ± 0,3 |
| MAE | 0,413 ± 0,028 | 0,335 ± 0,007 | 13,0 ± 0,9 | 0,278 ± 0,035 | 14,0 ± 0,9 | 14,4 ± 0,2 |
| UAE - banho de ultrassom | 0,307 ± 0,012 | 0,278 ± 0,013 | 13,5 ± 0,1 | 0,290 ± 0,028 | 14,4 ± 0,1 | 13,8 ± 0,8 |
| UAE - <i>cup horn</i> | 0,313 ± 0,008 | 0,281 ± 0,031 | 13,6 ± 0,2 | 0,282 ± 0,001 | 14,4 ± 0,2 | 14,1 ± 0,1 |

Valor de referência para As (MAD/ICP-MS) para alga: 18,8 ± 1,8 µg g⁻¹

Tabela 11 - Eficiência de extração, recuperação cromatográfica e balanço de massa para extração de espécies de As em alga, arroz e peixe. Valores expressos em %.

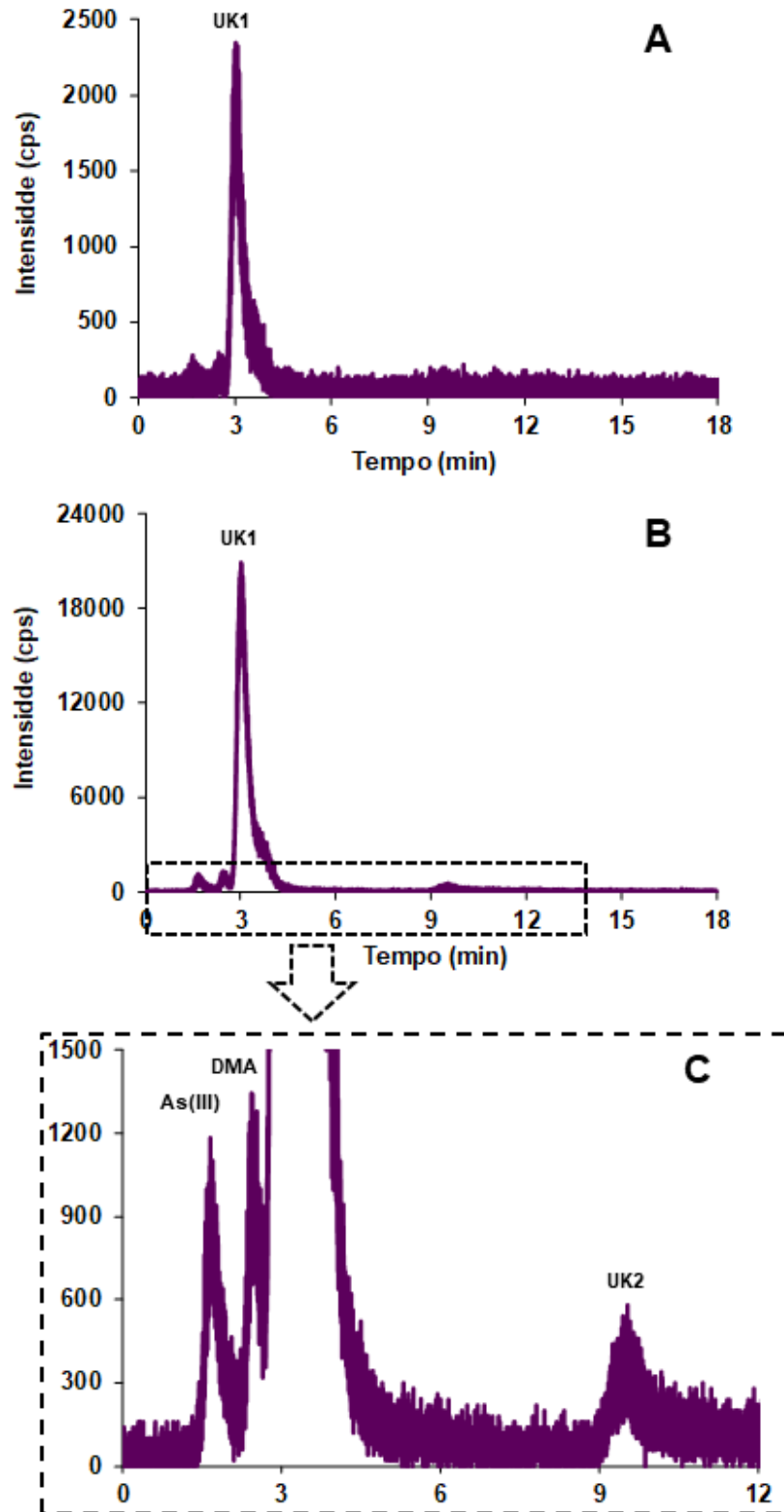
| Método de extração | Alga | | | Arroz | | | Peixe | | |
|--------------------------|------------------------|----------------------------|------------------|------------------------|----------------------------|------------------|------------------------|----------------------------|------------------|
| | Eficiência de extração | Recuperação cromatográfica | Balanço de massa | Eficiência de extração | Recuperação cromatográfica | Balanço de massa | Eficiência de extração | Recuperação cromatográfica | Balanço de massa |
| Extração convencional | 78 | 100 | 77 | 109 | 106 | 116 | 99 | 105 | 103 |
| MAE | 75 | 98 | 73 | 106 | 103 | 108 | 101 | 102 | 103 |
| UAE - banho de ultrassom | 77 | 104 | 80 | 99 | 100 | 99 | 92 | 91 | 84 |
| UAE - <i>cup horn</i> | 77 | 102 | 79 | 112 | 107 | 120 | 102 | 103 | 105 |

A concentração da espécie UK1 presente em alga variou entre 13,0 e 13,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, quando considerados os quatro métodos de extração utilizados, sendo que o desvio padrão relativo (RSD) para as medições foi inferior a 7% para todos os casos, mesmo executando os experimentos em duplicata. A concentração das espécies As(III), DMA e UK2 variaram de 0,278 a 0,413 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas determinações feitas em alga, representando uma fração muito pequena (cerca de 2% para cada espécie) na concentração total de As presente nessa amostra. Na Figura 25 estão mostrados os cromatogramas para alga nas duas diluições utilizadas para quantificação.

Como é possível observar para o extrato com fator de diluição de 2 vezes, a resolução entre os picos de DMA e UK1 não foi adequada. Uma vez que ocorreu sobreposição parcial entre os picos, a integração feita pelo *software* Origin 8 foi dificultada, tendo em vista que diversas vezes a área dos picos não foi considerada corretamente pelo software. Desse modo, optou-se por integrar o pico do DMA pela massa, de forma a estabelecer uma relação com a massa do pico de As(III) (“integrado” corretamente), tornando possível a quantificação com maior exatidão para a espécie DMA. Para isso, os cromatogramas foram impressos, os picos recortados de acordo com o mesmo padrão, pesados e, posteriormente, a concentração de As(III) e a massa do papel de cada pico foi usada para obter uma relação pela qual foi calculada a concentração de DMA.

O somatório da concentração de todas espécies presentes na alga variou entre 14,0 e 14,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, o que representa uma eficiência de extração entre 75 e 78%, quando comparada a concentração de As total determinada por ICP-MS após decomposição da amostra por MAD. Como discutido anteriormente, apesar dessas condições de extração apresentarem eficiência de extração razoável, apenas com a utilização de HNO_3 0,01 mol L^{-1} foi possível a preservação da espécie UK1 e nenhum dos ensaios para melhorar a eficiência ajudou a aumentá-la. Nesse sentido, cabe destacar que a recuperação cromatográfica para a quantificação das espécies de As em alga variou de 98 a 104%, mostrando que apesar de não ser obtida uma eficiência de extração próxima a 100%, a quantificação das espécies nos extratos foi adequada. Quando consideradas a eficiência de extração e a recuperação cromatográfica para alga, o balanço de massa calculado variou entre 73 e 80%.

Figura 25 - Cromatogramas para espécies de As em alga. (A) Extrato diluído 20 vezes, (B) extrato diluído 2 vezes, (C) detalhamento do cromatograma mostrado em B.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 18 min com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 8,0 mmol L⁻¹ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Na Tabela 12 estão mostrados os resultados para a quantificação das espécies de As na amostra de arroz, onde foi utilizada apenas uma diluição de 2 vezes, pois a concentração das espécies de As nessa amostra é bastante baixa. Contudo, foi necessária a diluição para adequação da fase móvel para que não ocorresse o *drift* da linha base. Nessa amostra foi possível quantificar as espécies de As(III) e DMA (Figura 26) em todos os procedimentos de extração. No caso do arroz, é possível observar que foi obtida uma boa eficiência de extração (entre 99 e 112%), quando considerada a concentração obtida pelo somatório das espécies e a determinada pela medição de As total nos extratos. Adicionalmente, foram obtidas recuperações cromatográficas entre 100 e 107%, enquanto que o balanço de massa variou entre 99 e 120%. Isso corrobora com o fato discutido durante os ensaios de otimização da extração das espécies de As em arroz, onde só foi possível obter extração quantitativa quando utilizadas concentrações mais elevadas de HNO₃, bem como maior tempo e temperatura de extração.

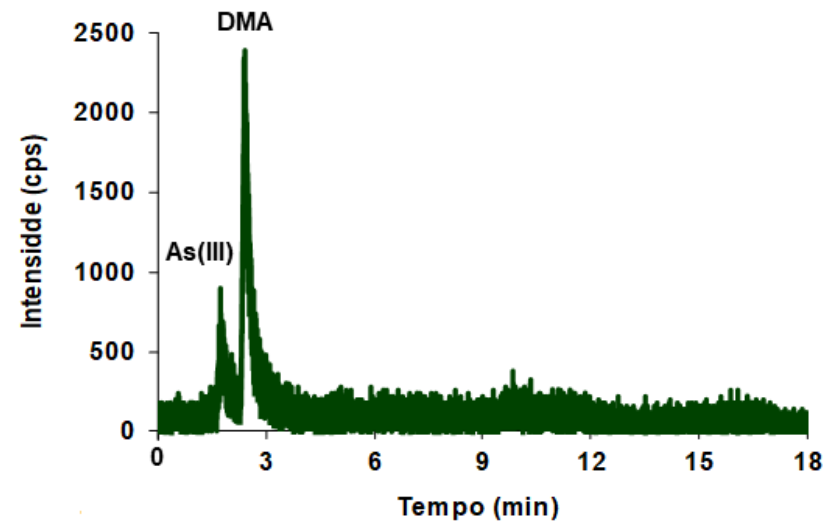
Quanto ao procedimento de extração utilizado para a amostra de arroz, pode ser observado na Tabela 12 que as concentrações das duas espécies [As(III) e DMA] foram similares, exceto para UAE - *cup horn*, para qual foi obtida uma maior concentração de As(III) que nos outros extratos. Contudo, os valores de concentração para a espécie As(III) não apresentaram diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$), bem como os resultados para concentração de DMA pelos diferentes métodos de extração. Cabe destacar que os resultados obtidos pelo somatório das espécies, e pela concentração de As total, tanto nos extratos quanto nos digeridos, não apresentaram diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 12 - Quantificação de espécies de As em arroz por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ como solução extratora. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, $n = 2$).

| Método de extração | Espécies de As (LC-ICP-MS) | | | As total |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | As(III) | DMA | Σ espécies | Extração/ICP-MS |
| Extração convencional | $0,143 \pm 0,009$ | $0,632 \pm 0,013$ | $0,774 \pm 0,016$ | $0,728 \pm 0,081$ |
| MAE | $0,136 \pm 0,042$ | $0,618 \pm 0,021$ | $0,753 \pm 0,047$ | $0,734 \pm 0,036$ |
| UAE - banho de ultrassom | $0,128 \pm 0,004$ | $0,578 \pm 0,014$ | $0,706 \pm 0,014$ | $0,707 \pm 0,077$ |
| UAE - <i>cup horn</i> | $0,189 \pm 0,055$ | $0,610 \pm 0,027$ | $0,799 \pm 0,062$ | $0,747 \pm 0,061$ |

Valor de referência para As (MAD/ICP-MS) para arroz: $0,713 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$

Figura 26 - Cromatograma para espécies de As em arroz.



Condições de separação: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 18 min com $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Para peixe, como esperado e relatado na literatura,¹⁵ a espécie presente majoritariamente foi a AsB, necessitando um fator de diluição de 100 vezes para essa quantificação. Os valores mostrados na Tabela 13 corroboram com essa informação, onde a concentração de AsB nos extratos variou entre 60,6 e 67,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, não apresentando diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre os diferentes procedimentos de extração.

A quantificação das demais espécies nos extratos foi feita utilizando um fator de diluição de 2 vezes. Cabe destacar, como mostrado na Figura 27, que os picos para as espécies de As(III), As(V) e UK4 foram pouco intensos, sendo que para alguns ensaios a concentração dessas espécies ficou próxima ao LOQ do método. Por outro lado, a espécie UK3 possui um sinal mais intenso, podendo ser quantificada em todos extratos de peixe, com concentração variando entre 0,567 e 0,588 $\mu\text{g g}^{-1}$, não apresentando diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre os métodos de extração.

Quanto ao somatório da concentração das espécies nos extratos, cabe destacar que não foram considerados os resultados daquelas que ficaram abaixo do LOQ. Os somatórios, a concentração de As total nos extratos e a comparação com a concentração de As total obtida por MAD/ICP-MS não apresentaram diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$). Ainda sobre a concentração de As nos extratos, essa representa uma eficiência de extração entre 92 e 102%.

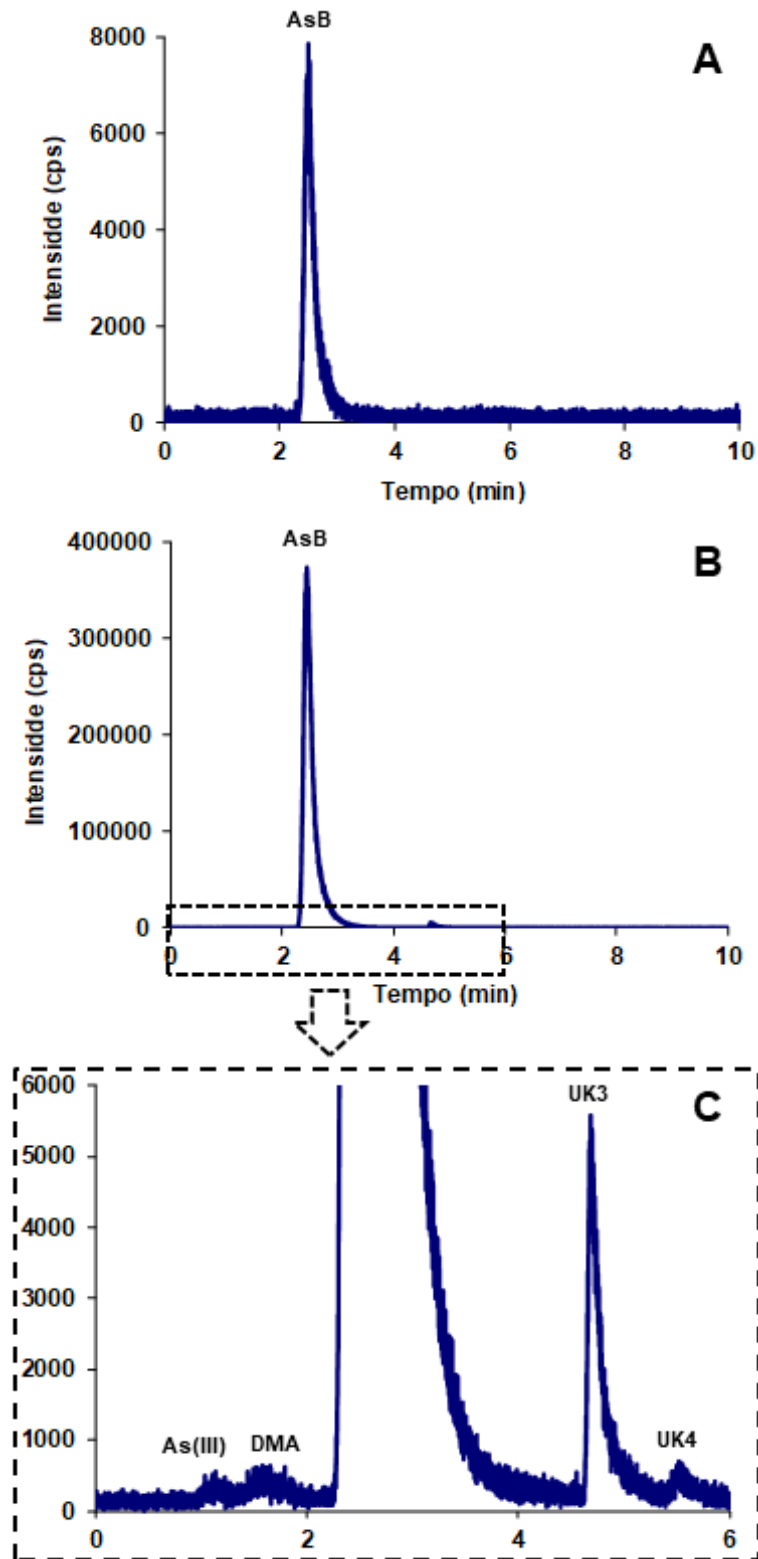
Adicionalmente, como forma de avaliação da exatidão, em todos os ensaios para as três amostras foram feitos ensaios de recuperação, com adição de concentração conhecida de espécies de As. Esses ensaios foram feitos adicionando o equivalente a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ das espécies de As(III) e DMA no extrato de alga (2 vezes diluído), 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) e DMA no extrato de arroz (2 vezes diluído) e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AsB no extrato de peixe (100 vezes diluído). Essas espécies foram escolhidas por estarem presentes nas amostras e o detalhamento do cromatograma está mostrado na Figura 28. Desse modo, o ensaio de recuperação teve por finalidade também avaliar se poderia estar ocorrendo alguma supressão ou aumento de sinal, bem como para confirmação do t_R das espécies. Nesses ensaios foram obtidas boas recuperações, entre 93 e 113%, e não foi observada alteração no t_R para as espécies conhecidas presentes na amostra.

Tabela 13 - Quantificação de espécies de As em peixe por LC-ICP-MS utilizando diferentes métodos de extração e H₂O como solução extratora. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm SD, n = 2).

| Método de extração | Espécies de As (LC-ICP-MS) | | | | | As total | |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | As(III) | DMA | AsB | UK3 | UK4 | Σ espécies | Extração/ICP-MS |
| Extração convencional | < 0,06 | 0,064 \pm 0,006 | 64,9 \pm 0,3 | 0,580 \pm 0,028 | 0,063 \pm 0,001 | 65,6 \pm 0,4 | 62,5 \pm 8,7 |
| MAE | < 0,06 | < 0,06 | 66,6 \pm 2,6 | 0,588 \pm 0,004 | 0,064 \pm 0,005 | 67,3 \pm 2,6 | 65,9 \pm 2,1 |
| UAE - banho de ultrassom | < 0,06 | 0,075 \pm 0,005 | 60,6 \pm 2,3 | 0,577 \pm 0,017 | 0,060 \pm 0,005 | 61,3 \pm 2,3 | 67,0 \pm 3,9 |
| UAE - <i>cup horn</i> | < 0,06 | 0,061 \pm 0,003 | 67,2 \pm 0,2 | 0,567 \pm 0,025 | 0,059 \pm 0,003 | 67,9 \pm 0,2 | 66,0 \pm 2,6 |

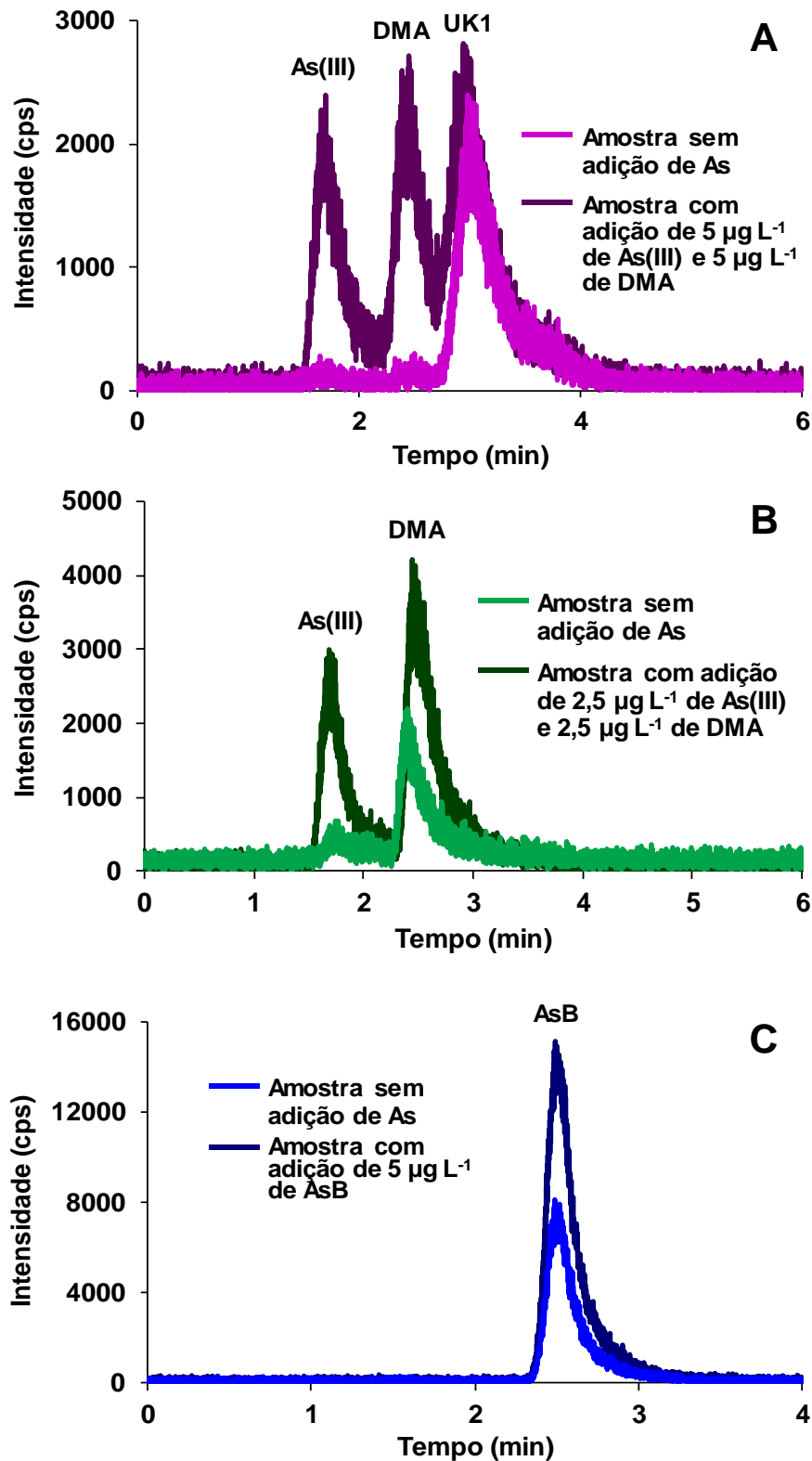
Valor de referência para As (MAD/ICP-MS) para peixe: 65,9 \pm 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$

Figura 27 - Cromatogramas para espécies de As em peixe. (A) Extrato diluído 100 vezes, (B) extrato diluído 2 vezes, (C) detalhamento do cromatograma mostrado em B.



Condições de separação: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Figura 28 - Cromatogramas para ensaio de recuperação nos extratos de (A) alga, (B) arroz e (C) peixe.

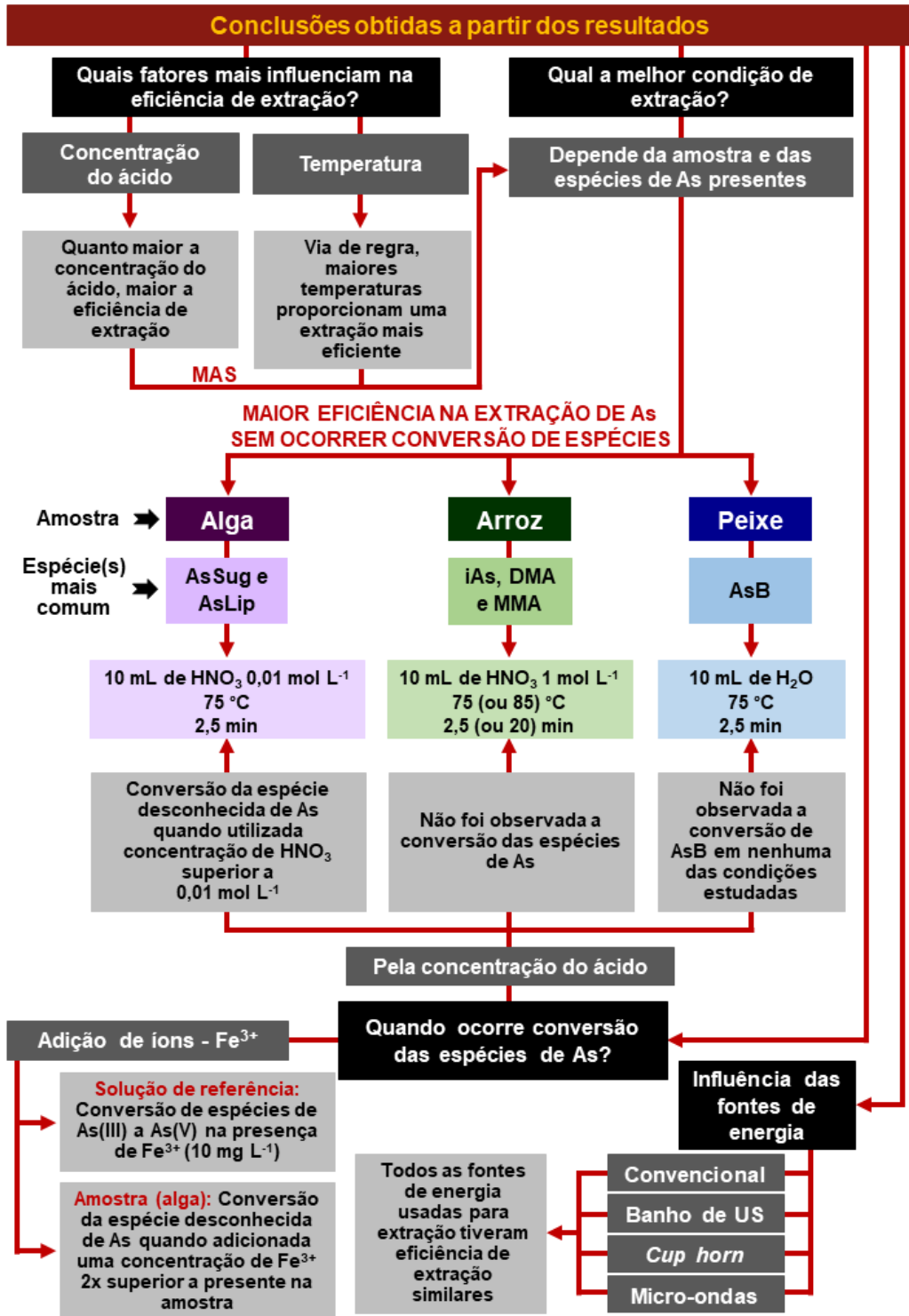


Condições de separação para A e B: Coluna de troca aniônica com eluição de 0 - 21 min com $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 8,0); Instrumento de ICP-MS: ELAN

Condições de separação para C: Coluna de troca catiônica com eluição de 0 - 10 min com piridina $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,65); Instrumento de ICP-MS: ELAN.

Na Figura 29 está mostrado um fluxograma que resume os principais fatores que foram observados quanto à eficiência de extração e estabilidade das espécies de As nas amostras de alga, arroz e peixe.

Figura 29 - Fluxograma sobre os parâmetros de extração avaliados e suas influências na eficiência de extração e estabilidade das espécies de As.



6 CONCLUSÃO

A análise de especiação requer muitos cuidados e condições que proporcionem a estabilidade das espécies desde a etapa de preparo de amostra até o momento da medição. Em virtude disso, a utilização de diferentes métodos de extração é possível, embora muitas vezes, os efeitos dos métodos utilizados na preservação das espécies de As não sejam discutidos e estudados criteriosamente nas publicações que tratam sobre o tema. De acordo com os objetivos propostos, e sobre os métodos de extração, com diferentes fontes de energia e agitação, foi possível observar que não houve diferença entre os resultados para extração utilizando extração convencional, MAE e UAE (banho de ultrassom e *cup horn*). Dentre os parâmetros que tiveram maior influência estão a temperatura de extração, concentração de HNO₃ utilizado como solução extratora e adição de Fe³⁺. Contudo, o comportamento em termos de eficiência de extração e estabilidade das espécies de As não foi o mesmo para todas as amostras e espécies de As.

Para a alga, a espécie majoritária (UK1) não é estável em concentrações de HNO₃ superiores a 0,01 mol L⁻¹, tampouco com a adição de Fe³⁺ com concentração superior a 3,2 mg L⁻¹. A espécie gerada pela conversão possui o mesmo t_R que o As(III), podendo assim assumir que a UK1 foi parcialmente convertida para As(III). Adicionalmente, no aspecto da quantificação, a solução extratora de HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ não foi capaz de possibilitar a extração total das espécies de As em nenhuma condição estudada, perfazendo uma eficiência de extração de cerca de 76%, recuperação cromatográfica de cerca de 100% e balanço de massa entre 73 e 80%.

Para o arroz, foi possível observar que a eficiência de extração é dependente tanto do tempo de extração quanto da temperatura de extração e da concentração da solução extratora. Contudo, diferentemente da alga, a concentração da solução de HNO₃ (até 1,0 mol L⁻¹) não causou conversão das espécies, pois as espécies de As(III) e DMA não foram convertidas, possibilitando assim a utilização dessa solução. A conversão das espécies de As no arroz foi observada apenas quando da presença no extrato de concentrações superiores a 0,2 mg L⁻¹ de Fe³⁺. Nesse caso, a presença de Fe³⁺ poderia estar influenciando tanto no equilíbrio entre as espécies iAs, quanto na conversão do DMA, uma vez que a proporção entre a concentração de As(III) e DMA manteve-se na amostra.

Diferentemente das amostras anteriores, no peixe foi possível observar que a espécie AsB é estável e condições onde apenas H₂O é utilizada como solução extratora são suficientes para a extração quantitativa desta espécie de As. Além disso, não foi possível observar condições onde a espécie AsB fosse convertida a outra espécie de As, nem mesmo quando da presença de Fe³⁺ ou HNO₃ em diferentes concentrações.

Assim, esse trabalho colabora para identificar possíveis variáveis para os estudos quanto à conservação das espécies de As, podendo ser utilizado futuramente para investigação no que diz respeito a reações de conversão de espécies de As, além de indicar quais fatores podem vir a prejudicar a confiabilidade na determinação de espécies de As em diferentes tipos de matrizes, bem como quais fatores podem melhorar ou piorar a eficiência de extração de algumas espécies.

REFERÊNCIAS

- 1 APOSTOLI, P. et al. **Elemental speciation in human health risk assessment**. Stuttgart: World Health Organization, 2006. 238 p.
- 2 CORNELIS, R. et al. **Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine and occupational health**. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005. 768 p.
- 3 WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 65, p. 122-136, 2015.
- 4 AMARAL, C. D. B.; NOBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants - A review. **Talanta**, v. 115, p. 291-299, 2013.
- 5 LI, P. et al. Concentrations and health risks of inorganic arsenic and methylmercury in shellfish from typical coastal cities in China: A simultaneous analytical method study. **Food Chemistry**, v. 278, p. 587-592, 2019.
- 6 RENEDO, M. et al. Assessment of mercury speciation in feathers using species-specific isotope dilution analysis. **Talanta**, v. 174, p. 100-110, 2017.
- 7 JAGTAP, R. et al. Measurement of selenomethionine and selenocysteine in fish tissues using HPLC-ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 248-257, 2016.
- 8 LLORENTE-MIRANDES, T.; RUBIO, R.; LOPEZ-SANCHEZ, J. F. Inorganic arsenic determination in food: A review of analytical proposals and quality assessment over the last six years. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 25-69, 2017.
- 9 FRANCESCONI, K. A.; KUEHNELT, D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. **Analyst**, v. 129, n. 5, p. 373-395, 2004.
- 10 BAIRD, C. **Química ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- 11 STANLEY, M. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2001. 993 p.
- 12 BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 abr. 1965.

- 13 BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 out. 2017.
- 14 BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 42, de 29 agosto de 2013. Dispõe sobre o regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 ago. 2013.
- 15 TAYLOR, V. et al. Human exposure to organic arsenic species from seafood. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 266-282, 2017.
- 16 MOLIN, M. et al. Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology - Review focusing on seafood arsenic. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 249-259, 2015.
- 17 CUBADDA, F. et al. Human exposure to dietary inorganic arsenic and other arsenic species: State of knowledge, gaps and uncertainties. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1228-1239, 2017.
- 18 POPP, M.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 114-129, 2010.
- 19 CLOUGH, R. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in elemental speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 7, p. 1103-1149, 2018.
- 20 KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 1 ed. São Paulo: EditSBQ, 2016. 572 p.
- 21 FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1 ed. Waltham: Elsevier, 2014. 416 p.
- 22 CHEN, G. Y.; CHEN, T. W. SPE speciation of inorganic arsenic in rice followed by hydride-generation atomic fluorescence spectrometric quantification. **Talanta**, v. 119, p. 202-206, 2014.
- 23 LETSOALO, M. R. et al. Selective speciation of inorganic arsenic in water using nanocomposite based solid-phase extraction followed by inductively coupled plasma-mass spectrometry detection. **Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 54, n. 9, p. 924-932, 2019.
- 24 CAUMETTE, G.; KOCH, I.; REIMER, K. J. Arsenobetaine formation in plankton: a review of studies at the base of the aquatic food chain. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 11, p. 2841-2853, 2012.

- 25 DONG CHEN, S. K. S., ACKMEZ MUDHOO. **Handbook on applications of ultrasound: Sonochemistry for sustainability**. Boca Raton: CRC Press, 2011. 704 p.
- 26 CAPOTE, F. P.; DE CASTRO, M. D. L. **Analytical applications of ultrasound**. Oxford: Elsevier, 2007. 398 p.
- 27 MASON, T. J.; LORIMER, J. P. **Applied sonochemistry: Uses of power ultrasound in chemistry and processing**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 314 p.
- 28 SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, v. 247, n. 4949, p. 1439-1445, 1990.
- 29 MOREDA-PINEIRO, A. et al. Alternative Solid Sample Pretreatment Methods in Green Analytical Atomic Spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 42, n. 6-7, p. 394-417, 2009.
- 30 HUERGA, A.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Speciation of the immediately mobilisable As(III), As(V), MMA and DMA in river sediments by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following ultrasonic extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 1, p. 121-128, 2005.
- 31 REYES, M. N. M. et al. Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 811-816, 2008.
- 32 GONZALVEZ, A. et al. Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 360-364, 2009.
- 33 GRIJALBA, A. C.; ESCUDERO, L. B.; WUILLOUD, R. G. Ionic liquid-assisted multiwalled carbon nanotube-dispersive micro-solid phase extraction for sensitive determination of inorganic As species in garlic samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 110, p. 118-123, 2015.
- 34 SANZ, E.; MUNOZ-OLIVAS, R.; CAMARA, C. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, n. 1-2, p. 1-8, 2005.
- 35 SANCHEZ-RODAS, D.; GOMEZ-ARIZA, J. L.; OLIVEIRA, V. Development of a rapid extraction procedure for speciation of arsenic in chicken meat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1172-1177, 2006.
- 36 MARIN, A.; LOPEZ-GONZALVEZ, A.; BARBAS, C. Development and validation of extraction methods for determination of zinc and arsenic speciation in soils using focused ultrasound - Application to heavy metal study in mud and soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, n. 2, p. 305-318, 2001.

- 37 REYES, M. N. M. et al. Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1078-1082, 2007.
- 38 D'AMATO, M. et al. Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound- and microwave-assisted extraction and anion exchange chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 207-213, 2011.
- 39 SANZ, E. et al. Arsenic speciation in rice, straw, soil, hair and nails samples from the arsenic-affected areas of Middle and Lower Ganga plain. **Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 42, n. 12, p. 1695-1705, 2007.
- 40 SANZ, E.; MUNOZ-OLIVAS, R.; CAMARA, C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, n. 1-2, p. 227-235, 2005.
- 41 PUMURE, I.; RENTON, J. J.; SMART, R. B. Accelerated aqueous leaching of selenium and arsenic from coal associated rock samples with selenium speciation using ultrasound extraction. **Environmental Geology**, v. 56, n. 5, p. 985-991, 2009.
- 42 SANZ, E. et al. Alternative extraction methods for arsenic speciation in hair using ultrasound probe sonication and pressurised liquid extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, n. 2, p. 131-139, 2007.
- 43 MOREDA-PINEIRO, A. et al. Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis - High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 39, p. 6970-6980, 2011.
- 44 REZENDE, H. C.; COELHO, N. M. M. Determination of total arsenic and arsenic(III) in phosphate fertilizers by hydride generation atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted extraction based on a control acid media. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 3, p. 736-741, 2014.
- 45 HUBER, C. S. et al. Sample preparation for arsenic speciation analysis in baby food by generation of substituted arsines with atomic absorption spectrometry detection. **Talanta**, v. 175, p. 406-412, 2017.
- 46 NOGUEIRA, R. et al. Arsenic speciation in fish and rice by HPLC-ICP-MS using salt gradient elution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1593-1600, 2018.
- 47 CHEN, S. Z.; GUO, Q. Z.; LIU, L. P. Determination of arsenic species in edible mushrooms by high-performance liquid chromatography coupled to inductively

- coupled plasma mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 3, p. 740-748, 2017.
- 48 CHEN, S. Y. et al. Simultaneous separation and determination of six arsenic species in Shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms: Method development and applications. **Food Chemistry**, v. 262, p. 134-141, 2018.
- 49 CORNELIS, R. et al. **Handbook of elemental speciation: techniques and methodology**. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 657 p.
- 50 MAHER, W. A. et al. Measurement of arsenic species in environmental, biological fluids and food samples by HPLC-ICPMS and HPLC-HG-AFS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 10, p. 2129-2183, 2015.
- 51 SUÑER, M. A. et al. Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS for the analysis of organoarsenical species in seafood samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 4, p. 390-397, 2001.
- 52 SERAFIMOVSKI, I. et al. Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 83, n. 2, p. 55-60, 2006.
- 53 FREIJE-CARRELO, L. et al. Instrumental setup for simultaneous total and speciation analysis of volatile arsenic compounds in gas and liquefied gas samples. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 11, p. 5720-5725, 2017.
- 54 YANG, G. D. et al. Speciation analysis of arsenic in *Mya arenaria* Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 471-476, 2009.
- 55 POPP, M.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 114-129, 2010.
- 56 WANG, R. Y. et al. Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, n. 2, p. 239-244, 2007.
- 57 SANTOS, C. M. M. et al. Evaluation of microwave and ultrasound extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 108-114, 2013.

- 58 GARCIA-SALGADO, S.; QUIJANO, M. A.; BONILLA, M. M. Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 38-46, 2012.
- 59 TANG, F. et al. Arsenic speciation in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) from China. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 269-275, 2015.
- 60 HU, K.; HOUK, R. S. Inductively coupled plasma mass-spectrometry with an enlarged sampling orifice and offset ion lens. II. Polyatomic ion interferences and matrix effects. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, n. 1, p. 28-37, 1993.
- 61 MULLER, A. L. H. et al. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v. 136, p. 161-169, 2015.
- 62 LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Boca Raton: CRC-Press, 2005. 2661 p.