

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

Francisco Cunha da Rosa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM DERIVADOS LÍQUIDOS DE ARROZ**

Santa Maria, RS
2018

Francisco Cunha da Rosa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE
ARSÊNIO EM DERIVADOS LÍQUIDOS DE ARROZ**

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 **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS
2018

Rosa, Francisco Cunha da

Desenvolvimento de método para análise de especiação
de arsênio em derivados líquidos de arroz / Francisco
Cunha da Rosa.- 2018.

136 p.; 30 cm

Orientador: Valderi Luiz Dressler

Coorientadores: Fábio Andrei Duarte, Érico Marlon de
Moraes Flores

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Arsênio 2. Análise de especiação 3. Derivados de
arroz 4. Eletroextração através de membrana 5. LC-ICP-MS
I. Dressler, Valderi Luiz II. Duarte, Fábio Andrei III.
Flores, Érico Marlon de Moraes IV. Título.

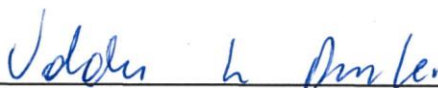
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Francisco Cunha da Rosa

Desenvolvimento de método para análise de especiação de arsênio em derivados líquidos de arroz

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 **Doutor em Ciências**.

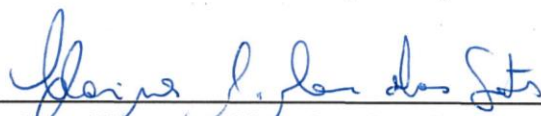
Aprovado em 14 de dezembro de 2018:



Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Dirce Pozebon, Dra. (UFRGS)



Clarissa Marques Moreira dos Santos, Dra. (UFPel)



Cezar Augusto Bizzi, Dr. (UFSM)



Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos Júlia e Pedro Francisco, para que saibam que precisamos lutar por aquilo que acreditamos que nos fará contribuir para uma sociedade mais justa e igualitária, à minha esposa Luiza, que sempre me acompanhou e me deu forças ao longo de toda essa jornada, aos meus pais João e Emília e à minha avó Neli Júlia, que me educaram para a vida e me tornaram um verdadeiro cidadão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade para a realização deste trabalho. Aqui personificada em dois de seus funcionários, meus amigos Ademir e Valéria.

Aos professores Dirce Pozebon, Clarissa M. M. Santos, Osmar D. Prestes e Cezar A. Bizzi pelas considerações extremamente construtivas para o aprimoramento deste trabalho e pela pronta disponibilidade em fazerem parte de minha banca examinadora.

A todos os competentes professores que compõe o LAQIA/CEPETRO da UFSM. Os professores: Érico Flores, Valderi Dressler, José Neri, Edson Müller, Rodrigo Bolzan, Cezar Bizzi, Paola Mello, Fábio Duarte, Jussiane Oliveira, Rochele Picoloto e Juliano Barin. Todos que certamente contribuíram de alguma forma para que eu chegasse a essa vitória.

Ao meu orientador, professor e amigo Valderi Dressler pela amizade, permanente disponibilidade, paciência e confiança sempre presentes desde a graduação até a concretização de mais essa etapa em minha vida.

Aos professores e amigos Érico Flores e José Neri pela amizade verdadeira, por todos os ensinamentos e pelas diversas oportunidades concedidas para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos, meu co-orientador Fábio Duarte e os professores Cezar Bizzi e Paola Mello, pessoas com quem aprendi a ser alguém melhor e por quem sempre nutrirei muito carinho e gratidão.

Aos queridos amigos que adquiri durante essa caminhada e que de alguma forma sempre contribuíram para meu crescimento: Matheus Gonçalves, Michele, Luiz Gustavo, Renan, Graciela, Flávia, Paula, Tássia, Samuel, Vinícius, Ana, Alessandra, Alcides, Gabriel e Mariele.

Ao IFRS pelo fomento à minha capacitação e aos meus colegas de trabalho e amigos: Giovani, Alessandra Smaniotto, Matheus Pedrotti, Nicéia, Tarcísio e Marinez.

Aos meus pais, que não mediram esforços para investir no maior bem que pode ser dado a um filho, a educação. Minha mãe, Emília, exemplo de profissionalismo, de resiliência e de determinação. Meu pai, João, exemplo de pai, de coerência e de verdade. Minha avó, Neli Júlia, sinônimo de amor e altruísmo.

À minha eterna companheira, amiga e amor para toda a vida, Luiza, pelo apoio, confiança e carinho durante toda essa caminhada, da graduação ao doutorado, com muito amor e cumplicidade.

Por fim, aos meus filhos, Júlia e Pedro Francisco, que me nutrem diariamente com muito amor e elevam minhas forças para lutar em busca de um mundo melhor, com menos desigualdade social e com oportunidades iguais para todos. Eles dão sentido a cada dia e a cada luta em minha vida.

*A ciência sem a religião é manca,
a religião sem a ciência é cega.*

(Albert Einstein)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM DERIVADOS LÍQUIDOS DE ARROZ

AUTOR: Francisco Cunha da Rosa
ORIENTADOR: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Em função da descoberta de intolerâncias relacionadas ao leite bovino e ao trigo, há uma demanda crescente por produtos derivados do arroz, tais como bebida de arroz (ou "leite de arroz"), cerveja, saquê, vinagre, entre outras. No entanto, esses produtos são potenciais detentores de concentrações elevadas de arsênio (As), uma vez que muitos estudos relatam que o arroz possui grandes quantidades deste elemento, quando comparado a outros alimentos. Nesse sentido, a legislação que regulamenta esses produtos restringe-se a estabelecer apenas limites para As total, sem considerar o fato de que há grandes diferenças de toxicidade entre as espécies conhecidas desse elemento. As formas inorgânicas, As(III) e As(V), são até 100 vezes mais tóxicas que as orgânicas, como o dimetilarsênio (DMA) e o monometiarsênio (MMA), sendo essas quatro espécies comumente detectadas no arroz. Diante disso, a determinação de As total não é suficiente, submetendo a maiores riscos os consumidores destes produtos. Por isso, é muito importante que se tenha informações mais completas sobre a concentração das espécies de As presentes nesses produtos derivados do arroz, o que pode ser obtido a partir da análise de especiação de As. Entretanto, para isso, as espécies devem ser mantidas em sua forma original, o que requer grande atenção ao preparo das amostras. Portanto, é necessário o emprego de métodos mais brandos, tais como extrações, que são relativamente morosas e susceptíveis a erros pelas etapas envolvidas. Sendo assim, buscando-se contornar alternativas morosas de preparo das amostras, neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de métodos mais simples e livres de solventes orgânicos, visando a análise de especiação de As por cromatografia à líquido de alta eficiência por troca de íons acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) em bebida, cerveja, saquê e vinagre de arroz. Nesse sentido, avaliou-se a simples diluição das amostras, o aquecimento para evaporação da matriz das amostras, a liofilização das amostras para remoção da matriz e a eletroextração através de membrana (EME). Além disso, parâmetros cromatográficos como tipo de fase móvel, concentração, vazão e pH da fase móvel foram avaliados, visando-se a condição mais para a separação de As(III), As(V), DMA e MMA. Os resultados foram obtidos a partir de uma condição cromatográfica abrangente e demonstraram que a simples diluição das amostras é satisfatória para a análise de especiação de As com bom nível de exatidão, na faixa de 80 a 120%, conforme os ensaios de recuperação, e pela comparação do somatório das espécies com a concentração de As total (teste *t*, com intervalo de confiança superior a 95%) obtida por ICP-MS, após decomposição via úmida assistida por micro-ondas (MAD). As amostras de bebidas de arroz e saquê foram as que apresentaram concentrações mais elevadas de As total (acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$). Houve predomínio das espécies inorgânicas (aproximadamente 50%), com exceção do saquê, em que predomina o DMA.

Palavras-chave: Arsênio. Análise de especiação. Derivados de arroz.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHOD FOR ARSENIC SPECIATION ANALYSIS IN RICE LIQUID DERIVATIVES

AUTHOR: Francisco Cunha da Rosa
ADVISOR: PhD. Valderi Luiz Dressler

From the discovery of intolerances related to bovine milk and wheat, there is a growing demand for derived products from rice, such as milk, beer, sake, vinegar, among others. However, these products are potential holders of high arsenic concentrations, since many studies report that rice has large amounts of this element when compared to other foods. In this sense, the laws regulating these products are restricted to setting only limits for total As content, without considering the fact that there are large differences in toxicity among the known species of this element. The inorganic forms, As (III) and As (V), are up to 100 times more toxic than organics, such as DMA and MMA, commonly detected in rice. Faced with this, the simple determination of total As may not be enough, putting many humans at risk. It is therefore very important to provide more complete information on the As species concentration present in these derived products, which can be obtained from the speciation analysis. However, for this purpose the species must be kept in their original form, which requires great attention in terms of sample preparation. Therefore, it is necessary to employ milder methods, such as extractions, which are relatively time consuming and error prone by the number of steps involved. Thus, in order to meet this demand, we proposed the development of simpler and organic solvent-free methods, aiming the As speciation analysis by LC-ICP-MS in rice milk, beer, sake and rice vinegar. In this way, we evaluated the simple dilution of the samples, the heating for evaporation of the sample matrix, the samples freeze-drying to remove the matrix and a new technique called electromembrane extraction (EME). Also, parameters such as salt type, concentration, flow rate and pH of mobile phase were evaluated, aiming at the most appropriate conditions for determining the species As(III), As(V), MMA and DMA. The results were obtained from a comprehensive chromatographic condition and demonstrated that the simple dilution of the samples is satisfactory for As speciation analysis with a good accuracy level, from 80 to 120%, according to the recovery tests, and by comparison of the species sum with the total As concentration (*t*-test, with confidence interval greater than 95%) obtained by ICP-MS, after microwave assisted wet digestion (MAD). The rice milks and sake were those with the highest concentrations of total As (above 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). There was a predominance of inorganic species (approximately 50%), with exception of sake, where DMA predominates.

Keywords: Arsenic. Speciation analysis. Rice derivatives.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de metabolismo proposto ao As em microorganismos.	26
Figura 2 - Esquema básico das diferenças entre a produção de cerveja, saquê e vinho.	36
Figura 3 - Exemplos de aparatos utilizados na (a) Eletroextração líquido-líquido; (b) Eletroextração trifásica; (c) EME; (d) E-SPE e (e) EE-SPME.....	47
Figura 4 - Esquema do sistema de LC-ICP-MS utilizado no trabalho. 1) Fase móvel; 2) Degaseificador a vácuo; 3) Bomba de HPLC; 4) Injetor; 5) Coluna guarda (troca aniônica); 6) Coluna analítica (troca aniônica) e 7) Instrumento de ICP-MS.....	57
Figura 5 - Aparato desenvolvido e utilizado para o emprego de EME em (a) fotografia do tubo de EME montado; em (b) esquema do tubo de EME, onde 1 e 2 representam as secções das fases doadora e acceptora, 3 representa a SLM e 4) a conexão onde a SLM é posicionada entre as duas secções; em (c) configuração utilizada para os eletrodos de tungstênio e em (d) configuração utilizada para os eletrodos de platina.....	67
Figura 6 - Fluxograma de resumo dos procedimentos preparo das amostras para a determinação de As total, demais elementos e análise de especiação de As.	72
Figura 7 - Efeito da concentração de fosfato de amônio como fase móvel: (a) 7,0 mmol L ⁻¹ ; (b) 9,0 mmol L ⁻¹ e (c) 11,0 mmol L ⁻¹ , todas a uma vazão de 1,00 mL min ⁻¹ , em pH = 6,00. (--) Solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz diluídos 1:4 (v v ⁻¹) em água.....	77
Figura 8 - Efeito da concentração de carbonato de amônio como fase móvel: (a) 9,0 mmol L ⁻¹ e (b) 30,0 mmol L ⁻¹ , todas a uma vazão de 1,00 mL min ⁻¹ , em pH = 8,58. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As.	79
Figura 9 - Efeito da vazão de fase móvel: (a) 0,90 mL min ⁻¹ ; (b) 1,00 mL min ⁻¹ e (c) 1,10 mL min ⁻¹ , empregando-se fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , em pH = 6,00. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz diluídos 1:4 (v v ⁻¹) em água.....	80
Figura 10 - Efeito da vazão de fase móvel: (a) 1,00 mL min ⁻¹ , (b) 1,10 mL min ⁻¹ e (c) 1,20 mL min ⁻¹ , em carbonato de amônio 30,0 mmol L ⁻¹ , pH = 8,58. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As.	82
Figura 11 - Efeito do tipo de diluente: (a) diluição em água e (b) diluição em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , pH = 6,00. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz, diluídos 1:4 (v v ⁻¹).....	84

Figura 12 - Efeito do tipo de diluente: (a) diluição em água e (b) diluição em fase móvel carbonato de amônio 30,0 mmol L ⁻¹ , pH = 8,58. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As.	85
Figura 13 - Efeito da adição de metanol junto à fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , pH = 6,00: (a) sem metanol e (b) com metanol 1% (v v ⁻¹). (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz, diluídos 1:4 (v v ⁻¹) na fase móvel.....	86
Figura 14 - Efeito da adição de metanol junto à fase móvel carbonato de amônio 30,0 mmol L ⁻¹ , pH = 8,58: (a) sem metanol e (b) com metanol 1% (v v ⁻¹). (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L ⁻¹ de As diluída em água.....	87
Figura 15 - Efeito do pH da solução de fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , vazão de 1,00 mL min ⁻¹ . (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) vinagre de arroz; (--) leite de arroz; (--) cerveja de arroz e (--) saquê, diluídos 1:2 (v v ⁻¹) na fase móvel.....	88
Figura 16 - Efeito do pH da solução de carbonato de amônio 30,0 mmol L ⁻¹ , vazão de 1,20 mL min ⁻¹ . (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 5,0 µg L ⁻¹ de As; (--) vinagre de arroz; (--) leite de arroz; (--) cerveja de arroz e (--) saquê, diluídos 1:2 (v v ⁻¹) em água.	90
Figura 17 - Cromatograma de uma solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 5,0 µg L ⁻¹ de As preparada em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , pH = 6,00 e vazão de 1,00 mL min ⁻¹	92
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos para as amostras diluídas 1:2 (v v ⁻¹) na fase móvel: (a) cerveja de arroz; (b) saquê; (c) vinagre de arroz e (d) leite de arroz, todos em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , pH = 6,00 e vazão de 1,00 mL min ⁻¹	93
Figura 19 - Efeito do etanol adicionado nas proporções volumétricas: (--) 0,1%, (--) 0,5% e (--) 1,0% (v v ⁻¹) em soluções contendo: (a) solução da fase móvel e (b) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 1,0 µg L ⁻¹ de As.	95
Figura 20 - Cromatograma da amostra de vinagre de arroz diluída 1:2 (v v ⁻¹) em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , pH 6,00.	97
Figura 21 - Cromatogramas obtidos para soluções preparadas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , com pH 6,00; em (a) apenas solução de fase móvel com adição de ácido acético a (--) 0,5%; (--) 1,0% e (--) 2,0% (v v ⁻¹) e em (b) solução de referência (--) contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 1,0 µg L ⁻¹ de As e adição de ácido acético a 1,0% (v v ⁻¹).	98
Figura 22 - Cromatogramas obtidos para soluções preparadas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , com pH 6,00; em (a) apenas solução de fase móvel com adição de metanol a (--) 0,5%; (--) 1,0% e (--) 2,0% (v v ⁻¹) e em (b) solução de referência (--) contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 1,0 µg L ⁻¹ de As e adição de metanol a 1,0% (v v ⁻¹).	99

Figura 23 - Cromatogramas obtidos para soluções preparadas com fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , com pH 6,00; em (a) apenas fase móvel com adição de metanol, etanol e ácido acético, todos em concentração 1,0% (v v ⁻¹) e em (b) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 1,0 µg L ⁻¹ de As, com adição dos três solventes na concentração de 1,0% (v v ⁻¹).	100
Figura 24 - Esquema de eletromigração na EME, sendo em amarelo a representação da fase doadora e em azul a representação da fase aceptora das espécies carregadas negativamente.....	115
Figura 25 - Efeito da ddp empregada no eletrodo de tungstênio para EME das espécies de As em uma solução contendo as mesmas em concentração equivalente a 5,0 µg L ⁻¹ de As. Onde: (--) 50 V; (--) 100 V e (--) 150 V.....	117
Figura 26 - Picos cromatográficos correspondentes à EME para soluções com as espécies As(III), DMA, MMA e As(V), em concentrações equivalentes a 5,0 µg L ⁻¹ de As; em (a) sem adição de etanol e em (b) com adição de etanol 4% (v v ⁻¹), ambos junto à solução de fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ (pH = 9,00). Onde: (--) fase inicial e (--) fase aceptora.....	118
Figura 27 - Curvas de calibração elaboradas a partir do emprego de EME para soluções de calibração em fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ (pH 9,00), contendo As(III), DMA, MMA e As(V).	119
Figura 28 - Cromatogramas obtidos para: (a) cerveja de arroz; (b) leite de arroz; (c) saquê e (d) vinagre de arroz. As amostras foram diluídas 1:1 (v v ⁻¹) em fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ (fase móvel, com pH 9,00) e submetidas à EME.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos de arsênio de relevância ambiental e humana.	24
Tabela 2 - Limites de As para bebidas e alimentos com base na Resolução RDC nº 42/2013.....	54
Tabela 3 - Condições instrumentais empregadas para a determinação de As total e para a análise de especiação de As.	58
Tabela 4 - Composição informada para as amostras de leite de arroz analisadas no trabalho.....	63
Tabela 5 - Concentração de As total obtido para todas as amostras.....	73
Tabela 6 - Resultados da análise elementar das amostras por ICP OES e ICP-MS. Os elementos Al, B, Ca, Fe, K, Mg, P e S foram determinados por ICP OES e os demais por ICP-MS.	74
Tabela 7 - Resultados obtidos para LD e LQ das espécies de As.	102
Tabela 8 - Análise de especiação de As por LC-ICP-MS após diluição das amostras na fase móvel, na proporção 1:2 (v v ⁻¹).....	103
Tabela 9 - Recuperações das espécies de As adicionadas às amostras diluídas 1:2 (v v ⁻¹) na fase móvel de modo a concentrações adicionais de 1,0 e 5,0 µg L ⁻¹ de As para as mesmas.	104
Tabela 10 - Análise de especiação de As nas amostras de cerveja mediante calibração externa com ajuste de matriz; 1,5% (v v ⁻¹) de etanol para a cerveja e 5,2% (v v ⁻¹) de etanol para o saquê.	105
Tabela 11 - Análise de especiação de As em leite de arroz e vinagre de arroz, com calibração por adição de padrão.	106
Tabela 12 - Equações de regressão linear das curvas de calibração utilizadas na análise de especiação de As em leite de arroz, cervejas, saquê e vinagre de arroz.	110
Tabela 13 - Análise de especiação de As por LC-ICP-MS nas amostras evaporadas e reconstituídas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , em pH = 6,00.	111
Tabela 14 - Resultados dos testes de recuperação dos analitos adicionados às amostras; 1,0 e 5,0 µg L ⁻¹ de As para cada espécie nas amostras diluídas 1:2 (v v ⁻¹) na fase móvel, antes da evaporação.....	112
Tabela 15 - Análise de especiação de As por IC-ICP-MS nas amostras liofilizadas e reconstituídas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L ⁻¹ , em pH = 6,00.	113
Tabela 16 - Resultados dos testes de recuperação das espécies adicionadas às amostras; com adição de 1,0 e 5,0 µg L ⁻¹ de As para cada espécie nas amostras diluídas 1:2 (v v ⁻¹) na fase móvel antes da liofilização...	114
Tabela 17 - Resumo dos resultados obtidos para a análise de especiação de As por LC-ICP-MS com troca de íons, comparando os quatro métodos propostos para preparo das amostras de leites de arroz, cervejas, saquê e vinagre de arroz.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS	Espectrometria de fluorescência atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
ASE	Extração acelerada por solvente
ATSDR	Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e de Doenças
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
CE	Eletroforese capilar
CRM	Material de referência certificado
CZE	Eletroforese capilar de zona
DEHP	Di-(2-etilhexil)fosfato
DMA	Ácido dimetilarsínico
DMPAO	Óxido de dimetilfenilarsina
EC	Comissão Europeia
EE-SPME	Microextração em fase sólida por eletroestimulação
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
E-LLE	Eletroextração líquido-líquido
EME	Eletroextração através de membrana
E-MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida assistida por campo elétrico
E-SPE	Eletroextração em fase sólida
FAO	Organização Conjunta de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas
FI	Injeção em fluxo
GC	Cromatografia à gás
GF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca
HG	Geração de hidretos
HG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos
HPLC	Cromatografia à líquido de alta eficiência
iAs	Arsênio inorgânico
IC	Cromatografia de íons
ICP	Plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

IPC	Cromatografia de pareamento iônico
JECFA	Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da OMS
LC	Cromatografia à líquido
LLE	Extração líquido-líquido
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MAD	Decomposição via úmida assistida por micro-ondas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDPAO	Óxido de metildifenilarsina
MPAO	Óxido de metilfenilarsina
Me ₄ As ⁺	Tetrametilarsênio
MMA	Ácido monometilarsônico
MPAA	Ácido metilfenilarsínico
MS	Espectrometria de massa
OES	Espectrometria de emissão óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDMS	Polidimetiloxano
PSDVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTDI	Ingestão diária tolerável provisória
SFC	Cromatografia em fluído supercrítico
SFE	Extração em fluído supercrítico
SLM	Membrana com líquido suportado
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
S-XRF	Fluorescência de raios-X com radiação síncroton
TBA	Tetrabutilamônio
TFA	Ácido trifluoracético
TMAO	Óxido de trimetilarsina
UAE	Extração assistida por ultrassom
USFDA	Agência Norteamericana sobre Drogas e Alimentos
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 ESPÉCIES DE ARSÊNIO E TOXICIDADE	23
2.2 ARSÊNIO NO ARROZ	27
2.3 PRODUTOS DERIVADOS DE ARROZ.....	32
2.3.1 Leite de arroz	33
2.3.2 Bebidas alcoólicas derivadas de arroz	35
2.3.3 Vinagre de arroz	38
2.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ARROZ E DERIVADOS.....	39
2.4.1 Métodos de preparo de amostras para análise de especiação de As	39
2.4.2 Técnicas instrumentais para análise de especiação de As	49
2.5 LEGISLAÇÃO SOBRE As EM ARROZ E DERIVADOS.....	53
3 OBJETIVOS	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	57
4.2 REAGENTES	60
4.3 MATERIAIS DIVERSOS.....	61
4.4 AMOSTRAS	62
4.4.1 Preparo das amostras para a determinação de As total e caracteri- zação elementar	63
4.4.2 Preparo das amostras para a análise de especiação de As	64
4.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE LC-ICP-MS PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As	67
4.5.1 Escolha da fase móvel	68
4.5.2 Avaliação da concentração de fase móvel	68
4.5.3 Avaliação da vazão de fase móvel	69
4.5.4 Avaliação do emprego de fase móvel como diluente	69
4.5.5 Avaliação do efeito de metanol sobre a análise de especiação de As	69
4.5.6 Avaliação do pH da fase móvel	70
4.5.7 Avaliação do efeito do etanol junto às amostras	70
4.5.8 Avaliação do efeito de outras substâncias orgânicas presentes nas matrizes analisadas	71
4.6 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As POR IC-ICP-MS.....	71
4.6.1 Determinação das espécies de As	71
4.6.2 Avaliação da exatidão	72
4.7 FLUXOGRAMA DE RESUMO DOS PROCEDIMENTOS	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL.....	73
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DAS AMOSTRAS	74
5.3 OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES MAIS ADEQUADAS PARA ESPECIAÇÃO DE As POR LC-ICP-MS	75
5.3.1 Avaliação da concentração de fase móvel	76

5.3.2 Avaliação da vazão da fase móvel	80
5.3.3 Avaliação da diluição das amostras em água ou na fase móvel	83
5.3.4 Avaliação do efeito do metanol junto à fase móvel	85
5.3.5 Avaliação do efeito do pH da fase móvel	87
5.3.6 Avaliação do efeito do etanol presente nas amostras	92
5.3.7 Avaliação do efeito de outras substâncias orgânicas presentes nas matrizes das amostras analisadas.....	96
5.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As NOS DERIVADOS DE ARROZ	101
5.4.1 Análise de especiação de As após diluição das amostras	102
5.4.2 Análise de especiação de As após evaporação das amostras.....	110
5.4.3 Análise de especiação de As após liofilização das amostras	112
5.4.4 Análise de especiação de As após eletroextração através de membrana	115
5.4.5 Comparação dos resultados obtidos pelos métodos propostos para análise de especiação de As	122
6 CONCLUSÕES	123
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos alimentos mais consumidos por diversos povos, sendo que seu consumo chega a uma estimativa de, no mínimo, 50% pela população mundial. Isso faz ascender uma grande preocupação, tendo em vista que esse alimento é conhecidamente detentor de elevadas concentrações de arsênio (As), quando comparado a outros alimentos provenientes de cultivos em terra (CHEN *et al.*, 2018; HEITKEMPER *et al.*, 2001).

O As, por sua vez, foi classificado como o primeiro elemento na lista de substâncias perigosas publicada pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e de Doenças (ATSDR) norte-americana (HUGHES *et al.*, 2011). Tal classificação, entre outros aspectos, decorre dos riscos potenciais do As à saúde humana, visto que se trata de um elemento classificado como carcinogênico, estando associado ao câncer de pele, de bexiga e de pulmão. Em nível agudo de intoxicação, sobretudo de As inorgânico (iAs), pode causar desde distúrbios gastrointestinais até a morte. Já em nível crônico, por exposição prolongada, pode levar a diabetes, doença pulmonar, doença cardiovascular e até distúrbios do desenvolvimento cognitivo (CHEN *et al.*, 2007; HSUEH *et al.*, 1998). No entanto, a simples determinação da concentração de arsênio total e seus riscos pode não ser conclusiva, uma vez que deste elemento derivam muitas espécies químicas com propriedades absolutamente diferentes, sobretudo, no que se refere à toxicidade. Nesse sentido, sabe-se da existência de diversas espécies de As, dentre as quais destacam-se às que possuem os estados de oxidação +3 (III) e +5 (V). Sendo que as espécies químicas inorgânicas arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)] chegam a ser até 100 vezes mais tóxicas que espécies orgânicas de As, como o ácido monometilarsônico (MMA) e o ácido dimetilarsínico (DMA). Sendo assim, para que se tenha resultados conclusivos sobre os riscos da ingestão de As a partir de um determinado alimento ou bebida, torna-se fundamental também o emprego da análise de especificação química desse elemento (HUGHES *et al.*, 2011).

De acordo com Sperling e Karst (2018), a determinação das espécies de um elemento que existem em uma matriz é vital em Química Analítica. O reconhecimento de sua importância se dá pela forte contribuição com outras áreas da ciência, tais como ambiental e biomédica. Nesse sentido, a principal evolução da especificação

química ocorreu nos últimos 40 anos, associada à evolução da associação de técnicas de detecção sensíveis, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com técnicas de separação altamente seletivas, tais como a cromatografia à líquido de alta eficiência (HPLC). Segundo esses autores, um dos principais motivos para o desenvolvimento de metodologias de análise de especiação química é a grande toxicidade de concentrações muito baixas de algumas espécies de um elemento, como ocorre justamente com as espécies inorgânicas do As, que são carcinogênicas.

Dessa forma, diante da toxicidade de espécies químicas de As e sua presença amplamente difundida no arroz, é de se esperar a existência das mesmas em seus derivados com consumo elevado nos últimos anos. O crescente mercado está relacionado basicamente a pessoas com intolerâncias associadas principalmente ao leite bovino e a alimentos à base de trigo, que contém glúten (CARBONELL-BARRACHINA *et al.*, 2012; MEHARG, *et al.*, 2008a). Dentre os produtos alternativos, podem-se citar o leite de arroz produzido industrialmente a partir da liquefação do grão por ação da enzima α -amilase em meio aquoso (CRUGNOLA e SRL, 2003), as cervejas oriundas do arroz, produzidas com até 40% de malte de arroz como um adjunto ao malte de cevada (MAYER *et al.*, 2014), a bebida oriental conhecida como saquê (vinho de arroz), manufaturado a partir da mistura de arroz polido com enzimas, leveduras e água até a obtenção do produto por sacarificação e fermentação simultâneas (JSSMA e NRIB, 2011) e o vinagre de arroz, produzido pela fermentação alcoólica do arroz, sucedida pela fermentação oxidativa do etanol a ácido acético (SIEPMANN *et al.*, 2016).

Diante disso, pesquisadores como Meharg *et al.* (2008a) procederam à análise de especiação de As em leite de arroz para determinar as concentrações de iAs, DMA e MMA com cromatografia à líquido por troca iônica (IC) associada a ICP-MS (LC-ICP-MS). Estes autores realizaram a análise cromatográfica após um preparo das amostras relativamente moroso, fazendo a extração das espécies mediante hexano, seguida da adição de ácido nítrico para precipitação de proteínas e posterior filtração, para enfim procederem à análise de especiação de As.

Também objetivando a análise de especiação de As em derivados líquidos de arroz, Huang *et al.* (2012) determinaram as espécies As(III), As(V), DMA e MMA em cerveja, vinagre, vinho e suco de uva por LC-ICP-MS, após diluição das amostras em água. Nesse estudo, além das espécies estudadas, os autores observaram um pico

desconhecido no cromatograma, que creditaram ser correspondente a uma espécie desconhecida de As nas amostras de bebidas alcoólicas e no vinagre de vinho. Em ambos os estudos (HUANG *et al.*, 2012; MEHARG *et al.*, 2008a), os autores relatam concentrações relativamente mais elevadas para a soma de iAs, seguido por DMA e, muito raramente, MMA. Além disso, fazem referência às legislações vigentes para As, geralmente comparando-as com o limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a água potável ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As total) (WHO, 2008). No entanto, há outras legislações que também podem ser consideradas nesse sentido. No Brasil, por exemplo, a Resolução - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece alguns limites para As total em alguns tipos de alimentos e bebidas. Para bebidas alcoólicas esse valor não pode exceder $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, para o leite bovino o limite é restritivo em $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para arroz e derivados (exceto óleo) não pode ultrapassar $300 \mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto, em nenhum desses casos há referência com relação às espécies de As, demonstrando um claro atraso dos órgãos regulamentadores em reconhecerem a diferença de toxicidade entre as espécies de As e a necessidade de leis que contemplem essa demanda (ANVISA, 2013).

Outro aspecto importante refere-se aos limites para a ingestão de As por seres humanos. Nesse sentido, a OMS regulamenta que o limite seguro de ingestão diária de As não pode ultrapassar $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corporal, o que está associado a limites bastante restritivos, sobretudo, para crianças (WHO, 1993; WILLIAMS *et al.*, 2005).

Dessa forma, pela potencial transferência de As contido no arroz para seus derivados, como já demonstrado nos estudos de Meharg *et al.* (2008a) e Huang *et al.* (2012), e pela grande diferença de toxicidade entre as espécies de As, torna-se fundamental o estudo e desenvolvimento de métodos mais simples, sem adição de solventes orgânicos para extrair as espécies, visando a análise de especiação de As em derivados líquidos de arroz, tais como bebidas de arroz como leite, cerveja e saquê, e condimentos como o vinagre. Uma vez que o Brasil ainda não possui métodos e normas para controle de espécies de As nesses produtos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESPÉCIES DE ARSÊNIO E TOXICIDADE

O As é o primeiro elemento na lista mais recente de substâncias perigosas publicada pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e de Doenças (ATSDR) norte-americana. Esta lista cita substâncias encontradas em locais de resíduos perigosos. Essas substâncias são classificadas na frequência ou ocorrência, toxicidade e potencial para exposição humana. O As pode ser considerado um contaminante natural, ao qual os humanos são rotineiramente expostos através de alimentos, água, ar e solo. Ao longo da história, o As já foi empregado como agente de suicídio, no controle de pragas, como pesticida, como agente quimioterápico e como constituinte de muitos produtos consumidos na dieta humana (HUGHES *et al.*, 2011).

Esse elemento químico é o causador de diversos tipos de doenças, possuindo elevado potencial carcinogênico. Em nível de intoxicação aguda causa vômitos, dor abdominal e diarreia. Esses sintomas são seguidos por dormência e formigamento das extremidades, câibras e até morte. Em nível crônico, após cinco anos de exposição ou mais, os sintomas podem ser observados por lesões na pele, que podem evoluir a câncer de pele. Além disso, também é conhecido como agente que causa câncer de bexiga e de pulmão. Outras moléstias também são observadas em intoxicações crônicas por As, tais como diabetes, doenças pulmonar e cardiovascular, além de efeitos sobre o desenvolvimento cognitivo, a inteligência e a memória (CHEN *et al.*, 2007; WHO, 2001; HSUEH *et al.*, 1998).

Para entendermos um pouco mais sobre as características desse elemento, torna-se necessário revisitarmos a tabela periódica, onde o As pode ser identificado como um metaloide do grupo 15 e 4º período. Por sua posição na tabela, a classificação periódica do As lhe confere tanto características comuns aos metais, com exceção da condutibilidade, quanto aos não metais, tais como a capacidade de formar ligações covalentes com elementos como carbono, hidrogênio e oxigênio. Sendo assim, os estados de oxidação mais comuns do As no meio ambiente são o +3 (III) e +5 (V), raramente estando presente nas formas As^0 , arsina e arsenida, estas contendo

As com carga -3. Sendo assim, as formas comuns, às quais estamos expostos, são a III e V. Na Tabela 1 são apresentadas as principais espécies de As nesses dois estados de oxidação (HUGHES *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Compostos de arsênio de relevância ambiental e humana.

(continua)

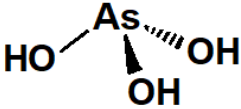
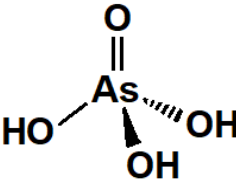
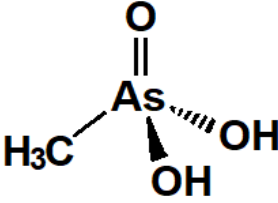
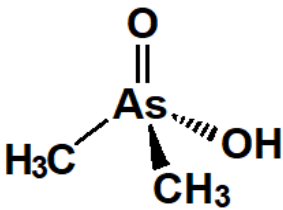
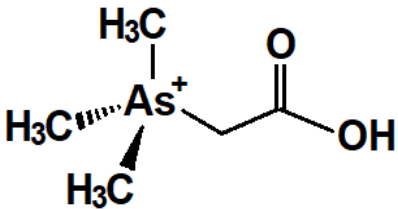
Estado de oxidação (III)	Estado de oxidação (V)
Arsenito (AsO_2^-)	Arsenato (AsO_3^-)
Trióxido de arsênio (As_2O_3)	Pentóxido de arsênio (As_2O_5)
Ácido arsenoso $[As(III) - H_3AsO_3]$	Ácido arsinílico $[As(V) - H_3AsO_4]$
	
$pK_{a1} = 9,2; pK_{a2} = 12,1 \text{ e } pK_{a3} = 13,4$	$pK_{a1} = 2,3; pK_{a2} = 6,9 \text{ e } pK_{a3} = 11,4$
Ácido arsínico $(HAsO_2)$	Ácido monometilarsônico $[MMA - CH_3AsO(OH)_2]$
$O=As-OH$ $pK_a = 9,3$	
	$pK_{a1} = 3,6 \text{ e } pK_{a2} = 8,2$

Tabela 1 – Compostos de arsênio de relevância ambiental e humana.

(conclusão)

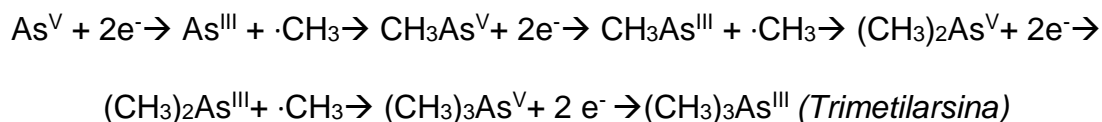
Estado de oxidação (III)	Estado de oxidação (V)
	<p>Ácido dimetilarsínico [DMA – (CH₃)₂AsO(OH)]</p>
	
	pK _a = 1,6
	<p>Arsenobetáina [AsB - (CH₃)₃As⁺ (CH₂)₂OH]</p>
	
	pK _a = 4,7

Fonte: Adaptado (HUGHES *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2018).

A forma química de um elemento nos alimentos determina o modo como pode ocorrer sua absorção no trato gastrointestinal e, por consequência, o processo metabólico que pode ocorrer (CORNELIS *et al.*, 2004). Segundo Cullen e Bentley (2005), o estudo do metabolismo do iAs em mamíferos pode ser embasado em estudos realizados ainda no século 19, sobre o metabolismo deste metalóide em microorganismos e a formação de uma espécie tóxica identificada como trimetilarsina. Nesse sentido, Hughes *et al.* (2011, *apud* CHALLENGER, 1947) inferem que o metabolismo do As se dá principalmente a partir da enzima metiltransferase, responsável pela redução do As pentavalente a As trivalente, seguido da metilação oxidativa dessa espécie à formação de novas espécies pentavalentes (Figura 1). É importante destacar que o entendimento do metabolismo do As é crucial e

determinante para o conhecimento dos efeitos tóxicos, modos de ação e carcinogenicidade das espécies deste elemento.

Figura 1 - Esquema de metabolismo proposto ao As em microorganismos.



Fonte: Adaptado (HUGHES *et al.*, 2011).

Segundo a literatura pertinente, as espécies trivalentes tendem a serem mais tóxicas que as espécies pentavalentes do As. Isso pode ser explicado pela maior reatividade das espécies trivalentes com compostos de enxofre no organismo humano, principalmente com o grupo tiol em proteínas, e pela geração de espécies reativas contendo oxigênio (HUGHES *et al.*, 2011). Nesse sentido, o As pode causar efeitos mutagênicos, teratogênicos, genotóxicos e neurotóxicos, que dependem diretamente das espécies de As presentes. O As(III) é mais tóxico que o As(V) e estes, por sua vez, tendem a serem centenas de vezes mais tóxicos que as espécies MMA e DMA. Adicionalmente, a arsenocolina (AsC) e a arsenobetaina (AsB), encontradas mais comumente em organismos marinhos, são classificadas como não tóxicas, enquanto que os arsenoaçúcares e arsenolipídeos possuem toxicidade muito baixa (NOGUEIRA *et al.*, 2018).

No entanto, estudos envolvendo análise de urina humana têm mostrado que há metabólitos de As trivalente metilado mais tóxicos que as espécies de As inorgânico. De acordo com Gong *et al.* (2002), a biometilação do As em humanos já havia sido considerada um processo de desintoxicação. Dessa maneira, os autores consideram importante o desenvolvimento de métodos de determinação de todos os metabólitos e intermediários da metilação do As. Esta informação pode fornecer pistas sobre o metabolismo de certas espécies de As em humanos.

Sendo assim, torna-se cada vez mais claro que a simples determinação de As total pode não ser suficiente para considerações clínicas e/ou ambientais completas sobre os possíveis efeitos nocivos do elemento sobre o organismo humano. Como mencionado, a toxicidade do As dependerá, sobremaneira, das espécies químicas

presentes. Por isso, estudos de especiação de As podem auxiliar para informações mais precisas sobre os impactos ambientais e riscos à saúde (GONG *et al.*, 2002).

Em relação à ingestão de iAs a partir da alimentação, por exemplo, é estimado que seja de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g dia}^{-1}$ por pessoa nos Estados Unidos, enquanto na União Européia essa estimativa fica na faixa de 0,13 a 0,56 $\mu\text{g dia}^{-1} \text{kg}^{-1}$ de massa corporal. As espécies ingeridas variam conforme o alimento, sobretudo, em função da sua origem terrestre ou marinha (HUGHES *et al.*, 2011).

Entre os alimentos comumente presentes na dieta humana, o arroz biocumula As, normalmente, em suas espécies mais tóxicas (NOGUEIRA *et al.*, 2018). De acordo com Heitkemper *et al.* (2001), as principais espécies de As encontradas no arroz são o As(III), As(V), DMA e MMA.

2.2 ARSÊNIO NO ARROZ

Em busca de artigos no Portal de Periódicos CAPES em agosto de 2018, empregando-se a expressão “*Arsenic in Rice*”, foram encontrados mais de 12 mil títulos relacionados, o que demonstra com clareza a difusão e importância da relação entre o arroz e a presença de As no mesmo.

O arroz é considerado um dos alimentos mais consumidos no mundo, atingindo no mínimo 50% da população global (CHEN *et al.*, 2018), e a concentração de As, principalmente iAs, nesse alimento pode ser considerada elevada, quando comparado a outros alimentos. Sendo assim, a análise de especiação de As em arroz e derivados é considerada particularmente importante em termos de avaliação de risco (HEITKEMPER *et al.*, 2001). É relatado em diversos trabalhos sobre análise de especiação de As em arroz (HEITKEMPER *et al.*, 2001; SCHOOF *et al.*, 1999; SON *et al.*, 2019) que a quantidade de As encontrada supera a ingestão diária considerada segura, que será mencionada adiante.

Kumarathilaka *et al.* (2018) observaram que a acumulação de As no arroz pode depender tanto de fatores ambientais, quanto de fatores genéticos associados à planta. Esses autores também citam que as espécies migram de diferentes formas na planta, fazendo com que no grão do arroz sejam observadas maiores concentrações das espécies inorgânicas As(III) e As(V) e das orgânicas MMA e DMA. Ressaltam

ainda, que essa característica se deve ao arsenato substituir o fosfato no transportador, devido às semelhanças químicas entre arsênio e fósforo.

Como já mencionado, a toxicidade do As depende da forma química como esse elemento está presente no arroz e também da bioacessibilidade desse elemento em nosso organismo. Ou seja, depende se a espécie de As é capaz de ser absorvida no trato gastrointestinal (ALTHOBITI *et al.*, 2018). Dessa maneira, para que este parâmetro fosse avaliado para o arroz, Althobiti *et al.*(2018) analisaram treze tipos de arroz, utilizando saliva e suco gástrico artificiais. Complementarmente, foi feita a análise dos efeitos da lavagem e do cozimento do arroz sobre a concentração das espécies de As. Nesse estudo, a concentração de As total variou entre 93 e 989 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a bioacessibilidade variou de 16 a 93%. Os autores ainda observaram que o cozimento provocou a interconversão das espécies de As em poucos casos e que a lavagem dos grãos antes do cozimento é capaz de remover de 3 a 43% do As presente.

Meharg *et al.* (2008b) investigaram a localização do As em grãos de arroz empregando fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (S-XRF) e, conjuntamente, procederam a análise de especiação de As. Foram analisadas cerca de 80 amostras de arroz branco e integral, empregando LC-ICP-MS por troca de íons, após submeter as amostras a um processo de extração. Nesse os autores concluíram que a concentração de iAs foi superior no arroz integral, quando comparado ao arroz branco polido.

Com o aumento da industrialização na China nas últimas décadas, pesquisas sobre a presença de As no arroz tem sido efetuadas. Nesse sentido, Cd e As total foram determinados por ICP-MS após decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MAD), em 160 amostras de arroz polido, originadas de diferentes regiões daquele país. Adicionalmente, foi feita a análise de especiação de As nas mesmas amostras, empregando LC-ICP-MS por troca de íons. Para As total, as concentrações variaram de 0,011 a 0,186 mg kg^{-1} , sendo 69% correspondete a iAs (As(III) + As(V)) e 31% a DMA (CHEN *et al.*, 2018).

Empregando dois padrões internos (As(V) e AsB), para contornar problemas associados ao tempo dos picos cromatográficos e a interferências de matriz, Son *et al.* (2019) obtiveram recuperações superiores a 90% para iAs, DMA e MMA em amostras de material referência certificado (CRM) de farinha de arroz (*NIST SRM 1568b rice flour*). Neste estudo, foram comparados dois métodos de extração, um com

ácido malônico e outro com ácido nítrico, ambos devidamente diluídos. Segundo os autores, a proposta de uso dos padrões internos atingiu os objetivos propostos e o método envolvendo a extração com ácido nítrico pode ser utilizada para a análise de especiação de As em arroz.

Baba *et al.* (2008) extraíram As(III), As(V), ácido difenilarsínico, ácido fenilarsônico, ácido metilfenilarsínico (MPAA), óxido de dimetilfenilarsina (DMPAO) e óxido de metildifenilarsina (MDPAO) em amostras de solo contaminadas com essas substâncias e em arroz cultivado nos solos analisados. Foram encontradas concentrações consideráveis (na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ de As) das espécies de As inorgânico, DMPAO e MDPAO na palha de arroz e de MPAA no grão de arroz, provando a capacidade de migração das espécies de As do solo contaminado para o arroz cultivado no mesmo.

Sob o argumento de que na Ásia a maior fonte de As para os indivíduos desta região se dá a partir da ingestão do arroz, Arao *et al.* (2011), empregando LC-ICP-MS por troca iônica, investigaram a influência de dois diferentes cultivos do arroz sobre a concentração das espécies As(III), DMA e MMA. Adicionalmente verificaram o efeito da metilação do As quando cultivado em água sob supressão de atividade bacteriana. Os autores verificaram aumento da concentração de DMA, acompanhado do decréscimo das outras espécies do elemento no grão de arroz integral, quando cultivado em áreas inundadas, reforçando a hipótese de metilação favorecida neste caso. O contrário ocorreu para culturas sem inundação do solo com água e com o emprego de antibacteriano na água.

Alguns anos depois, o mesmo grupo de Arao *et al.* (2018) conduziram um estudo sobre o efeito da temperatura do ar sobre a concentração de As durante o crescimento do arroz. No estudo que levou em conta o histórico meteorológico entre os anos de 1995 e 2014, os autores verificaram maior correlação entre o incremento da temperatura do ar e o aumento da concentração de iAs, o que não foi claramente verificado para as demais espécies.

Recentemente, no Brasil, para especiação de As em arroz e peixe, foi proposta uma metodologia alternativa na análise por LC-ICP-MS por troca de íons, mais rápida, em que foram determinadas as espécies AsB, As(III), As(V), DMA e MMA, a partir de uma pequena variação na composição da fase móvel. Para tanto, foi proposto um programa de 15 min eluição por gradiente, empregando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com concentrações de 1 até 10 mmol L^{-1} em pH 10. Esta condição, segundo os autores,

supera em rapidez a já conhecida eluição isocrática, mediante coluna de troca aniônica PRP-X100 da *Hamilton*. No entanto, o tempo de eluição é similar ao relatado em outros estudos, que envolvem análise de especiação de As por cromatografia de troca aniônica, com a coluna PRP-X100. Nos extratos de uma amostra de arroz analisada, a concentração encontrada de As(III) foi $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e a de DMA foi $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que as demais espécies (AsB, As(V) e MMA) não foram detectadas nessa amostra (NOGUEIRA et al., 2018).

Na busca por métodos que garantissem uma extração quantitativa, viabilizando a posterior análise de especiação de As, Huang *et al.* (2010) comprovaram que o emprego de HNO_3 $0,28 \text{ mol L}^{-1}$, a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 90 min, é suficiente para a extração quantitativa das espécies As(III), As(V), DMA e MMA do arroz, sem haver conversões das espécies. Adicionalmente, os autores mencionam que o HCl pode provocar a redução do As(V) para As(III), o que leva a erros na especiação de As. Ao final, os autores alertam para a necessidade de um posterior ajuste de pH dos extratos a fim de evitar interferências nas medidas por LC-ICP-MS com troca de íons e/ou danos às colunas cromatográficas utilizadas.

A partir do estabelecimento de legislação específica para o teor máximo de iAs no arroz em 200 ng g^{-1} (CODEX), Chaney *et al.* (2018), em estudo interlaboratorial, propuseram um método mais barato para a determinação específica de iAs. Foi proposta análise por injeção em fluxo (FI) com geração de hidretos (HG) acoplada com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), após extração das amostras de arroz com HNO_3 $0,28 \text{ mol L}^{-1}$, seguido por aquecimento e posterior adição de HCl 4 mol L^{-1} , visando a redução de As(V) para As(III).

Norton *et al.* (2009) propuseram a determinação de DMA e iAs por LC-ICP-MS por troca iônica, após extração com HNO_3 1% (v v^{-1}), entre outras avaliações, em arroz provenientes de três diferentes países asiáticos, com concentrações conhecidamente elevadas de As total. Além disso, Pizarro *et al.* (2003a) determinaram As(III), As(V), DMA e MMA por LC-ICP-MS com troca de íons, comparando três diferentes condições de extração das espécies em arroz. No sentido de propor novas alternativas de preparo das amostras de arroz, empregando extração enzimática assistida por ultrassom, Sanz *et al.* (2005) também determinaram As(III), As(V), DMA e MMA por LC-ICP-MS com troca iônica. Seguindo o mesmo método de preparo da amostra, com

separação e detecção similares, Sanz *et al.* (2007) determinaram em arroz do Nepal, entre outras amostras, as espécies AsB, As(III), As(V), DMA e MMA.

Adicionalmente, Williams *et al.* (2005) avaliaram a concentração das espécies de As presentes no arroz e em palha de arroz, bem como a presença de As na dieta humana. O trabalho envolveu amostras, provenientes de países asiáticos e da América do Norte. Zavala *et al.* (2008) analisaram 24 amostras de arroz provenientes de diferentes regiões dos Estados Unidos. Os maiores teores encontrados foram de As(III) e DMA, corroborando resultados obtidos em outros estudos com respeito a espécies de As em arroz. Os resultados ainda revelam que o arroz norte americano é mais rico em DMA do que iAs, ao contrário do que ocorre no arroz da Ásia. Yuan *et al.* (2005) compararam diferentes métodos de extração das espécies de As em arroz e determinaram por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) precedida por LC-HG. Neste trabalho os melhores resultados foram obtidos a partir de extração assistida por micro-ondas (MAE), através da combinação de etanol e água, reportando maiores concentrações de iAs.

Recentemente, diversos trabalhos associados à presença de As no arroz e sua análise de especiação tem sido conduzidos. Em 2018, além dos estudos já mencionados acima, destacam-se a análise de especiação de As em órgãos de ratos tratados com extratos de arroz (LEWCHALERMVONG *et al.*, 2018) e em arroz e seus derivados na Bélgica (RUTTENS *et al.*, 2018). Em ambos os casos, as espécies predominantes foram de iAs e DMA.

No Brasil, Batista *et al.* (2011) determinaram, por LC-ICP-MS, As(III), As(V), DMA, MMA e AsB em 44 amostras de arroz de diferentes regiões do país, estimando que a ingestão de 88 g dia⁻¹ de arroz pode levar as pessoas a atingirem 10% do limite de ingestão diária tolerável provisória (PTDI) para iAs. Além disso, os autores observaram o predomínio das espécies de iAs, seguidas por DMA em todas as amostras, com destaque para o arroz proveniente do Rio Grande do Sul. Por sua vez, Cerveira *et al.* (2015) determinaram iAs e As(III) em 13 amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS) após extração das espécies de As com HNO₃ diluído. A espécie As(V) foi determinada pela diferença entre iAs e As(III). De acordo com esses autores, os resultados obtidos são concordantes com o que é reportado nos demais estudos sobre análise de especiação de As no arroz.

Ainda no Brasil, Segura *et al.* (2016) procederam a análise de especiação de As por LC-ICP-MS, para a comparação entre o arroz orgânico e o arroz convencional. Nesse sentido, os autores concluíram haver diferenças significativas entre as concentrações de As total para os casos comparados, com maiores valores sendo obtidos para o arroz orgânico. Além disso, o arroz orgânico apresentou mais de 40% de iAs em comparação ao convencional.

Em termos de legislação internacional, a União Européia, através da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) estabeleceu limites para iAs (As(III) + As(V)) em arroz polido (200 ng g^{-1}), em arroz parboilizado (250 ng g^{-1}) e em bolachas, cereais e bolos derivados do arroz (300 ng g^{-1}) (EC, 2015). Paralelamente a isso, a Agência norteamericana sobre Drogas e Alimentos (USFDA) estabeleceu em 100 ng g^{-1} o limite de iAs em cereais de arroz destinados a crianças (FDA, 2016).

A partir dos estudos relacionados com o As no arroz, estudos mais recentes sobre análise de especiação estão voltados também aos derivados desse alimento, tais como cereais matinais, bolachas e condimentos. Esse interesse fundamenta-se no fato desses produtos terem um consumo crescente, em função de distúrbios alimentares em humanos, tais como intolerâncias à lactose e ao glúten. Devido a isso, Sun *et al.* (2009) procederam a análise de especiação de As(III), As(V), DMA e MMA por LC-ICP-MS com troca iônica, em derivados de arroz e, assim como em outros estudos relacionados exclusivamente ao arroz, supramencionados, os autores encontraram maiores concentrações de iAs e DMA nas amostras estudadas.

Sendo assim, o que se observa nos diversos estudos sobre análise de especiação de As no arroz, é que as espécies de iAs e DMA são predominantes nesse alimento (CAREY *et al.*, 2012; KUMARATHILAKA *et al.*, 2018; MANTHA *et al.*, 2017; ZAVALA *et al.*, 2008). Além disso, com base em alguns estudos, também se evidencia a capacidade de lixiviação das espécies de As em meios aquosos (ALTHOBITI *et al.*, 2018), o que pode levar à contaminação de bebidas e alimentos líquidos produzidas a partir do arroz.

2.3 PRODUTOS DERIVADOS DE ARROZ

Diante da série de estudos mencionados anteriormente, percebe-se que o interesse sobre a presença de As no arroz persistiu nos últimos anos, mas parece

ainda haver muitas dúvidas sobre o tema. Nesse sentido, como já mencionado, alguns pesquisadores também já realizaram estudos a respeito de derivados sólidos, tais como cereais matinais, bolachas e pães originados de farinha de arroz (MUNERA-PICAZO *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2009) enquanto outros destinam-se a este propósito em derivados líquidos do arroz, tais como leite (MEHARG *et al.*, 2008a) e bebidas alcoólicas (HUANG *et al.*, 2012; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2009).

Sendo assim, no Brasil, estes estudos ainda são insipientes e requerem especial atenção. Pedron *et al.* (2016) procederam a análise de especiação de As por LC-ICP-MS com troca iônica em alimentos derivados de arroz, tais como purê, bolacha, pão e leite, entre outros. Para tanto, as espécies foram submetidas a extração com 10 mL de HNO₃ 2% (v v⁻¹) com aquecimento convencional a 95 °C durante 2,5 horas. Os autores observaram que iAs foi predominante em todos os casos estudados. Santos *et al.* (2017) determinaram As total, DMA, As(III) e As(V) por HG-AAS em amostras sólidas similares, com a inclusão de cerveja, leite em pó, vinho e vinagre, todas derivadas de arroz. Para as amostras sólidas o predomínio de iAs chegou a 80% da concentração de As total.

Desse modo, visto que a transferência do As presente no arroz para seus derivados é possível (ALTHOBITI *et al.*, 2018), cabe aos órgãos regulamentadores brasileiros atenção e fiscalização também sobre estes produtos. Sobretudo, no que tange ao processo de produção e quais espécies de As podem estar presentes nos mesmos. Por isso, seguem abaixo algumas considerações sobre produtos líquidos manufaturados a partir do arroz.

2.3.1 Leite de arroz

Basicamente envolvendo uma lixiviação aquosa de grãos de arroz, o leite de arroz é industrialmente produzido pela liquefação do grão, por ação da enzima α -amilase em meio aquoso formando uma pasta aquosa, seguido de uma etapa de sacarificação com a enzima glucosidase e, por fim, pela adição complementar de minerais e vitaminas não presentes originalmente no produto, mas que o deixa mais próximo do leite de origem animal (CRUGNOLA e S.R.L., 2003; MEHARG *et al.*, 2008a). De forma mais artesanal, pode ser obtido pela extração com água quente,

mas sem as adições acima mencionadas, no processo industrial (MEHARG *et al.*, 2008a).

Apesar dos inúmeros benefícios que o leite de origem bovina pode gerar, tais como o bom valor nutricional, a prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, entre outros (FERNANDEZ *et al.*, 2015), o mesmo torna-se inadequado para consumidores que tem intolerância à lactose e/ou alergia a proteínas do leite bovino (DREBORG, 2015). Dessa maneira, a fim de contornar isto, foram desenvolvidos substitutos do leite bovino, tais como as bebidas denominadas comercialmente como leite de soja, leite de aveia e, mais recentemente, o leite de arroz.

No entanto, apesar do leite de arroz ser uma alternativa ao leite bovino, suas principais desvantagens podem estar associadas ao arroz que, como mencionado anteriormente, é uma das principais fontes de As na dieta humana, principalmente das formas inorgânicas do elemento que são conhecidamente as mais tóxicas (SHIBATA *et al.*, 2016; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2016). Sendo assim, alguns trabalhos tem sido desenvolvidos a fim de determinar As total e espécies químicas deste elemento em leite de arroz. Neste sentido, Meharg *et al.* (2008a) determinaram espécies de As inorgânico, DMA e MMA em 19 amostras de leite comercial produzido na Europa e em 16 amostras (8 provenientes de arroz integral e 8 de arroz branco polido) produzidas em laboratório, a partir da extração de arroz em água sob aquecimento. As amostras de arroz utilizadas para a produção do leite de arroz foram originárias de diversos países. No referido estudo, tal como já observado para arroz, o iAs foi majoritário, com concentração média de $13,4 \mu\text{g L}^{-1}$. Nas amostras comerciais, foi possível observar que a concentração de As total variou de 10,2 a $33,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e que, os teores de iAs variaram de 60 a 80% do total de As presente, enquanto que o restante do As correspondeu, principalmente, ao DMA. Apenas em três amostras o MMA foi maior que o limite de quantificação (LQ). No que se refere aos extratos produzidos em laboratório, a média dos valores para As total foi cerca de 60% menor do que no leite comercial, com uma distribuição similar entre as espécies. Nessa segunda avaliação os autores ainda demonstraram que 30 a 78% do iAs presente no arroz migrou para os extratos, enquanto que o percentual de migração variou de 5 a 24% para o DMA. Essa diferença, possivelmente, está associada à maior solubilidade do iAs em água.

2.3.2 Bebidas alcoólicas derivadas de arroz

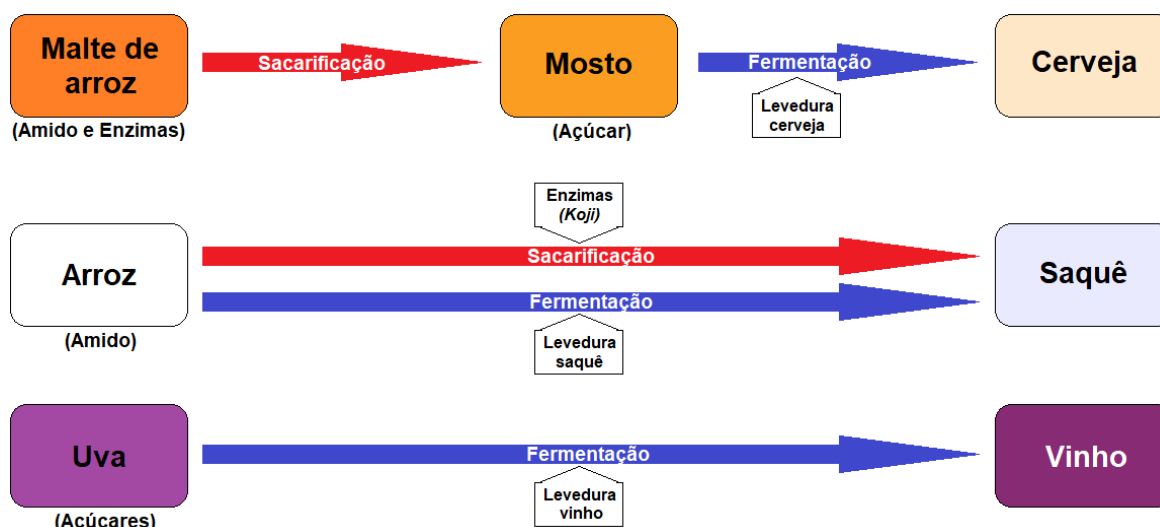
Como uma boa alternativa aos celíacos (intolerantes ao glúten), para que possam consumir bebidas alcoólicas como cerveja, há as que contêm o malte de arroz como um adjunto do malte de cevada, contornando o problema comum às cervejas produzidas a partir do trigo. Além disso, a introdução do arroz na composição das cervejas pode acrescentar novos aromas, gostos e aspectos físico-químicos às mesmas (MAYER *et al.*, 2014). Os ingredientes principais de uma cerveja são água, malte, levedura e lúpulo. Desse modo, no Brasil, o Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997 determina que uma bebida pode ser considerada cerveja quando contem no mínimo 20% de malte de cevada em sua composição. Sendo assim, parte do malte restante poderá ser substituído pelos denominados adjuntos cervejeiros, cujo teor não poderá ultrapassar 45% do extrato primitivo. Dessa forma, algumas grandes produtoras de cerveja tem utilizado até 40% de malte de arroz em seus produtos. Adicionalmente, no mesmo decreto está previsto que o teor alcoólico mínimo na cerveja com álcool deve ser igual ou superior a 0,5% do volume da bebida, sendo que em média este valor é geralmente de 4,0 a 6,0% (FARINI e BORGES, 2016; FILHO, 2005; JSSMA e NRIB, 2011).

Em 2010, Sleiman *et al.* (2010) identificaram que mais de 4% das cervejas comerciais brasileiras tipo *Pilsen* já continham malte de arroz em sua composição. Podendo este ser obtido tanto a partir de flocos de arroz gerados a partir de farinhas umedecidas e aquecidas quanto do subproduto da moagem industrial do arroz comestível. Sendo assim, para a produção de cerveja com base no arroz, é importante destacarmos que aproximadamente 40% da mistura é composta por malte de arroz. Por sua vez, o malte de arroz tem sido produzido em etapas que envolvem primeiramente a preparação do grão que, após sucessivas lavagens, é umedecido durante aproximadamente 5 dias em temperatura ambiente controlada até quando os grãos começam a gerar raízes. Em seguida, é feita a secagem com ar quente corrente próximo aos 50 °C, para finalmente iniciar a etapa de produção da cerveja com base neste malte seco. A esse malte é adicionado água e iniciado o processo de produção da cerveja (produção do mosto, adição de lúpulo, fermentação, maturação, filtração e, quando desejável, pasteurização) (D'AVILA *et al.*, 2012; MAYER *et al.*, 2014).

Diferentemente da cerveja, o saquê, por sua vez, envolve basicamente o arroz tratado em um processo em que são adicionadas enzimas (*Koji*) para a sacarificação,

acompanhada da adição de leveduras do saquê para o processo de fermentação, gerando o saquê. Na Figura 2, há um esquema que resume as diferenças entre cerveja produzida a partir do arroz, saquê e vinho de uva, que é similar ao saquê em alguns aspectos, tanto que o saquê chega a ser denominado, por vezes, como vinho de arroz (JSSMA e NRIB, 2011).

Figura 2 - Esquema básico das diferenças entre a produção de cerveja, saquê e vinho.



Fonte: Adaptado (JSSM e NRIB, 2011).

Com teor alcoólico na faixa de 13 a 17%, o saquê é uma bebida tipicamente japonesa, semelhante, em aparência, ao vinho branco e produzida principalmente a partir da mistura entre arroz e água. Seu processo de produção se dá em diversas etapas, durante 4 dias, de arroz polido macerado e cozido junto ao *Koji* e à água. Além disso, no primeiro dia é adicionada a cultura de leveduras selecionadas (*Shobu*), previamente preparada e altamente acidificada para a prevenção de proliferação microbiana indesejada. Após os 4 dias de sacarificação e fermentação em temperaturas controladas (8 a 18 °C), a mistura passa pelas etapas de filtração por pressionamento, sedimentação, nova filtração, pasteurização em garrafas e, em alguns casos, envelhecimento em garrafas ou tanque e nova pasteurização (JSSMA e NRIB, 2011).

Sendo assim, com base nas quantidades de arroz utilizadas no processo de produção da cerveja e do saquê, fica clara a possível transferência do As presente no arroz para essas bebidas, onde a concentração do elemento pode variar. Por esse motivo, alguns trabalhos tem sido conduzidos no sentido da determinação de As total

e suas espécies em amostras desta natureza (HUANG *et al.*, 2012; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2009).

Nesse sentido, Huang *et al.* (2012) analisaram amostras de vinho, vinagre de vinho, suco de uva e cerveja, entre as quais alguns tipos de vinho e cerveja continham arroz. Neste estudo, além de As total, foram determinadas as espécies As(III), As(V), DMA e MMA por LC-ICP-MS, mediante uma coluna de troca aniônica, além das espécies AsB, AsC, TMAO e tetrametilarsônio em coluna de troca catiônica. Nas amostras de vinho de arroz, foram encontrados 0,01 a 3,67 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III); 0,01 a 9,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(V); abaixo de 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MMA e 0,01 a 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DMA. Nas amostras de cerveja de arroz foram encontrados 2,78 a 5,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III); 0,72 a 3,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(V); abaixo de 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MMA e 0,01 a 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DMA. Os autores ainda destacam que a concentração de As total em muitas amostras eram superiores aos limites máximos permitidos em água potável (10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os autores ainda relatam que, quando compararam os resultados obtidos para as cervejas com os obtidos por Herce-Pagliai *et al.* (1999), também em cervejas, houve uma discrepância entre as concentrações das espécies. Pois, neste segundo estudo, as espécies MMA e DMA, nesta ordem, estavam presentes em concentrações superiores do que a concentração de iAs, quando separadas por cromatografia à líquido por troca iônica e determinadas por geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica (LC-HG-AAS).

Huang *et al.* (2012) identificaram um pico cromatográfico desconhecido em tempo de retenção próximo a 5 minutos no cromatograma, entre os picos das espécies MMA e As(V), quando da análise de amostras alcoólicas tanto derivadas, quanto não derivadas de arroz. Adicionalmente, os autores ainda identificaram outro pico, também denominado “desconhecido”, após o pico do As(V), quando da análise de especiação de As nas amostras de vinagre de uva. Em ambos os casos, a análise foi feita mediante coluna de troca aniônica *Hamilton PRP-X100*, com tampão fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} em pH 6,00 como fase móvel e vazão de fase móvel de 1,00 mL min^{-1} .

Signes-Pastor *et al.* (2009) determinaram espécies de As em bebidas doces de arroz fermentado e em condimentos à base no arroz. Tal como nas amostras de arroz já mencionadas nos estudos citados no “Item 2.2”, o iAs é predominante, correspondendo de 63 a 83% do As total presente nas amostras, sendo o restante DMA. Entre as amostras analisadas neste estudo, cita-se o *Koji*, enzima utilizada na

produção do saquê. Desse modo, iAs e DMA foram determinados por LC-ICP-MS, com troca de íons, após extração das amostras com HNO₃ 1% (v v⁻¹), assistida por MAE e os valores encontrados foram comparados com o As total determinado por ICP-MS após decomposição ácida da amostra assistida por micro-ondas (MAD). A amostra de *Koji* continha 0,12 mg kg⁻¹ de As total, sendo 0,070 mg kg⁻¹ de iAs e 0,041 mg kg⁻¹ de DMA.

2.3.3 Vinagre de arroz

Conhecido há mais de 5 mil anos, o vinagre é um condimento produzido por fermentação alcoólica, quando os carboidratos são convertidos a etanol, sucedida por fermentação acética, quando o etanol é oxidado a ácido acético. Na produção do vinagre, torna-se necessário o emprego de matérias-primas contendo amido e / ou açúcares fermentescíveis (SIEPMANN *et al.*, 2016).

O vinagre pode ser produzido a partir de vários tipos de frutas e cereais e sua classificação é feita conforme a matéria prima utilizada neste processo. Desse modo, como o vinagre tradicional é produzido a partir de alimentos regionais, de acordo com os costumes de cada região, em países asiáticos o arroz é a principal matéria prima para a produção deste condimento (JOHNSTON e GAAS, 2006). De acordo com a Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 745, de 24 de outubro de 1977, o vinagre deve conter, no mínimo, 4 g de ácido acético por 100 mL do produto e no máximo 1% (v v⁻¹) de etanol, medido a 20 °C (RIZZON e MENEGUZZO, 2001).

Além desses teores gerais acima citados, para ser classificado como vinagre de arroz, é necessário que o produto seja originado 100% a partir desse grão. Desse modo, o arroz (que contém amido) é misturado à água e, por ação enzimática, é inicialmente convertido a dissacarídeos e monossacarídeos fermentescíveis. A partir disso, esses açúcares são convertidos em etanol por ação das leveduras em um processo anaeróbio. Por fim, as bactérias acéticas, na presença do ar (aproximadamente 20% de O₂), conduzem o processo de acetificação a partir da oxidação do etanol, que fora produzido na etapa anterior. Sendo assim, quando atingidos os teores mínimos de acidez e máximos de álcool residual, estipulados pela

Instrução Normativa nº 6, de 03 de abril de 2012, o vinagre de arroz está pronto (VELOSO, 2013).

Embora não tenha sido uma das amostras alvo do trabalho de Huang *et al.* (2012), em seu estudo, esses autores determinaram As(III), As(V), DMA e MMA em amostras de vinagre de vinho. Nesse sentido, foram encontradas concentrações de As total na ordem de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ nessas amostras, sendo que a única espécie conhecida a ser quantificada foi As(III), correspondendo um máximo de 20% da concentração total. O restante da concentração total de As, como já mencionado, foi atribuído a uma espécie desconhecida que eluiu após o sinal do As(V), sendo presumida pelos autores como uma espécie de As possivelmente derivada dos açúcares fermentados na complexa matriz do vinagre. Porém, ressalta-se que, neste estudo, a concentração total parece ter sido obtida apenas pela soma das espécies, sem comparação com uma técnica diferente para esse propósito (HUANG *et al.*, 2012).

Sun *et al.* (2009), determinaram As total em amostras de vinagre de arroz, encontrando concentrações na faixa de 0,01 a 0,03 mg L^{-1} . Esses autores também fizeram análise de especiação de As em alimentos sólidos à base de arroz e os mesmos destacam que os valores de concentração de As normalmente encontrados em alimentos líquidos derivados do arroz são inferiores ao que se observa nos derivados sólidos deste cereal. Segundo eles, isso possivelmente está associado à diluição das espécies de As em grandes quantidades de água incorporadas aos derivados líquidos, como o vinagre e o leite de arroz. Adicionalmente, os autores comentam que os níveis de As total encontrados são similares aos de estudos com leite de arroz e que, para o vinagre, ingerido em pequenas quantidades como condimento, o teor de As não é preocupante. Porém, o mesmo não pode ser afirmado para o leite de arroz.

2.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ARROZ E DERIVADOS

2.4.1 Métodos de preparo de amostras para análise de especiação de As

Antes de qualquer preparo das amostras visando a posterior análise de especiação química, um requisito imprescindível é a preservação das amostras a fim de se manterem as características originais das espécies do elemento presentes.

Nesse sentido, foi observado que a estabilidade das espécies de As em amostras aquosas é dependente de temperatura, tempo de armazenamento, pH e potencial redox do meio. As(III) e As(V) são predominantes em água por causa da solubilidade dos mesmos. A oxidação de As(III) para As(V), em concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, não foi perceptível por até 21 dias, quando as amostras foram armazenadas em temperatura abaixo de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Já, no caso de concentrações maiores, por exemplo, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de As em água, foi observado que não ocorreram conversões significativas, mesmo quando armazenadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dessa forma, para baixas concentrações de As em meio aquoso, recomenda-se o armazenamento em temperaturas próximas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para a melhor preservação das espécies. Além disso, métodos de extração podem auxiliar na preservação das espécies (GONG *et al.*, 2002).

De acordo com Cornelis *et al.* (2004), as etapas requeridas para análises confiáveis de amostras biológicas de cunho alimentar, vão desde: a) coleta e manuseio adequados das amostras; b) estocagem em local adequado; c) avaliação da estabilidade das espécies até a análise; d) pré-tratamento adequado das amostras, contando com uma boa eficiência de extração das espécies a partir da matriz; e) processos de limpeza (do inglês, *clean-up*) após a separação; f) possível pré-concentração e derivatização adequadas a técnicas de determinação sensíveis. Por esse motivo, conforme esses autores indicam, a extração e/ou “*clean-up*” são alternativas viáveis para evitar efeitos de matriz e garantir análises de especiação química eficientes. Outros meios de evitar efeitos de matriz são a extração do analito e, quando possível, diluir a amostra.

Como em todos os métodos analíticos, a etapa de preparação da amostra está entre as mais problemáticas na análise de especiação química. Por esse motivo, os estudos mais recentes buscam substituir técnicas clássicas de extração por outras que, principalmente, viabilizem a redução no volume necessário de solventes, o uso de solventes menos tóxicos e a redução do tempo necessário na execução desta etapa. Para isso, algumas alternativas tem sido propostas, como a simples dissolução das espécies contidas nas amostras por ação de solventes aquosos ou orgânicos menos tóxicos. Outros estudos basearam-se no emprego de hidrólise ácida, básica ou enzimática, enquanto outros envolveram extração em fase sólida (SPE), em fluido supercrítico (SFE) e acelerada com solvente (ASE) (CORNELIS *et al.*, 2004).

Pode-se afirmar que as principais fontes de erro da análise de especiação química estão associadas à amostragem, armazenamento e preparo das amostras.

Quanto mais procedimentos forem realizados, mais erros podem ocorrer. Por isso, com relação à amostragem de amostras líquidas, tais como o leite, é recomendada a agitação vigorosa das amostras antes da subamostragem; para líquidos espumantes, a degaseificação com auxílio de ultrassom ou injeção de gás inerte e para líquidos que possuam algum precipitado, é recomendada a decantação das amostras antes da subamostragem. Com relação ao armazenamento, os principais erros estão associados à adsorção de espécies no recipiente que contém a amostra e à estabilidade das mesmas. Por fim, com relação à extração, o principal problema normalmente está associado à baixa eficiência de extração das espécies a partir da matriz (CORNELIS *et al.*, 2004).

A maioria dos procedimentos de extração para a análise de especiação de As relatados é dedicada a amostras sólidas. De acordo com Heitkemper *et al.*(2001), há diversos procedimentos de extração para a análise de especiação de As em amostras sólidas, com destaque para organismos marinhos e arroz. Nesse sentido, os autores citam as extrações assistidas por ultrassom (UAE) ou por micro-ondas (MAE), as ASE e as extrações assistidas por simples agitação manual. Entretanto, segundo os mesmos autores, a extração de iAs em amostras biológicas tem sido mais difícil, sobretudo, pela possível dificuldade dos solventes em romperem as ligações entre As(III) e o grupo tiol (-SH) presente nas proteínas da matriz.

No estudo conduzido por Heitkemper *et al.*(2001) foi proposta a avaliação de quatro diferentes técnicas de extração de As em arroz. Para esta finalidade, avaliaram o emprego de metanol 50% (v v⁻¹) como solvente para UAE. Este procedimento foi comparado com a ASE em equipamento próprio para tal, com extração enzimática com α -amilase e, finalmente, com a extração por ácido trifluoracético (TFA) 2 mol L⁻¹ durante 6 horas a 100 °C. O último procedimento foi escolhido como condição de compromisso no trabalho. No entanto, observa-se que todos os métodos propostos são morosos e, geralmente, requerem a evaporação do solvente com posterior reconstituição do resíduo antes da análise por LC-ICP-MS com troca iônica.

Com respeito a amostras líquidas a simples diluição, SPE, microextração em fase sólida (SPME), extração gás-líquido e extração líquido-líquido (LLE) podem ser viáveis. Assim, é possível combinar a extração e a preconcentração das espécies, além de, em alguns casos, ser possível a combinação com a derivatização das espécies. No entanto, de modo geral, essas extrações tendem a ser morosas, envolvendo várias etapas para sua execução (CORNELIS *et al.*, 2004).

Na extração em fase sólida, os analitos são extraídos por sorção, eluídos com uma pequena quantidade de solvente e, geralmente, seguida da derivatização das espécies. Apesar das várias vantagens frente à LLE, a SPE requer que as amostras sejam previamente filtradas, demandando às vezes o emprego de solventes orgânicos. Ao contrário do que ocorre com a SPME, que é a miniaturização da SPE e requer quantidades menores de solventes. Neste caso, o procedimento pode ser executado como uma seringa inserida diretamente na solução amostra para a extração de espécies solúveis na água, ou em “*headspace*” para a extração das espécies voláteis, ou com o uso de membranas de microfibras contendo um solvente embebido, tais como as membranas de polidimetilsiloxano (PDMS), as quais já foram empregadas inclusive para especiação de As em amostras de água e urina (CORNELIS *et al.*, 2004).

A extração líquido-líquido, por sua vez, pode ser empregada para amostras não filtradas, no entanto, o volume necessário de solventes é elevado, assim como o tempo de extração. Além disso, como normalmente os extratos são apolares, espécies polares necessitam de complexação de modo a formar um composto apolar e, para emprego de LC-ICP-MS, faz-se necessária a evaporação dos solventes orgânicos com posterior reconstituição das amostras em meio aquoso. Já na extração *Purge and Trap* um gás inerte deve ser borbulhado em uma solução aquosa a fim de extrair espécies apolares voláteis. Em seguida, esses gases são *criotrapiados* e liberados dentro de uma coluna (empacotada ou capilar), passando normalmente para a análise por GC. Para As, esse método requer prévia reação para a geração de hidretos de As, a fim de formar as espécies voláteis requeridas (AMMANN, 2011; CORNELIS *et al.*, 2004).

Sendo assim, as espécies de As dificilmente são separadas por GC e, por esse motivo, as metodologias mais empregadas para análise de especiação de As são as que envolvem LC-ICP-MS. Esta requer, entretanto, que as amostras sejam introduzidas na forma de soluções aquosas filtradas (normalmente em filtro com diâmetro de poro de 0,20 a 0,45 μm), prevenindo o entupimento da coluna analítica. Nesse sentido, as principais espécies de As determinadas por LC-ICP-MS são As(III), As(V), MMA, DMA, AsB e arsenoaçúcares (CORNELIS *et al.*, 2004).

Em relação ao preparo de amostras líquidas, como já mencionado, Meharg *et al.* (2008a) determinaram iAs, DMA e MMA em leite de arroz, de soja e de aveia por LC-ICP-MS com troca de íons. No preparo das amostras, visando a análise de

especificação de As, adicionaram 1 mL de hexano para a extração das espécies e remoção da gordura da amostra. Em seguida, adicionaram HNO₃ 1% (v v⁻¹) para precipitar as proteínas. Após, a mistura foi filtrada para a análise por LC-ICP-MS. Porém, os autores não informam como e se foi removido o hexano adicionado. Complementarmente, os autores analisaram as alíquotas de gordura e proteína, não observando perda de As para estas fases. Em leite de arroz comercial, foi adicionado 0,05 mL de H₂O₂ para a oxidação de As(III) a As(V), para melhorar os limites de detecção (LD) e LQ de iAs.

Empregando uma coluna de troca aniônica *Hamilton PRP-X100*, Huang *et al.* (2012) determinaram as espécies As(III), As(V), DMA e MMA, por LC-ICP-MS, em vinagre, vinho de arroz (saquê), cervejas comuns e cervejas de arroz. Para a determinação de As total, 10 mL das amostras alcoólicas foram previamente incubados e aquecidos (60-70 °C) para a completa evaporação do etanol e, após, foram digeridas com ácido nítrico e peróxido, sendo o As determinado por ICP-MS. Nesse estudo de análise de especificação, o As foi determinado diretamente nas amostras diluídas em água na proporção 1:4 (v v⁻¹). Foram identificados diversos sinais desconhecidos durante a análise, podendo estar associados a efeitos de matriz, ainda que os autores façam referência a possíveis espécies de As não identificadas. Herce-Pagliai *et al.* (2002) determinaram As(III), As(V), DMA e MMA em diversas amostras de vinho do sul da Espanha, empregando LC-HG-AAS com troca de íons. No referido estudo verificaram a predominância das espécies MMA e DMA, tal como o observado pelo, já mencionado Herce-Pagliai *et al.*(1999) em amostras de cerveja.

Além disso, ainda em relação a amostras líquidas, Jakson *et al.* (2012) determinaram iAs, MMA e DMA em várias amostras, dentre elas, xarope de arroz. Neste estudo, as espécies foram extraídas das amostras através de MAE, com um programa de aquecimento até 95 °C por 30 min, utilizando HNO₃ 1% (v v⁻¹) como solvente extrator. A seguir os extratos foram centrifugados e a fase sobrenadante foi coletada e utilizada para a análise de especificação em uma coluna de troca aniônica *Hamilton PRP-X100* por LC-ICP-MS, com solução tampão de fosfato de amônio 20 mmol L⁻¹, em pH 8 como fase móvel. Nos xaropes de arroz, a soma das concentrações das espécies de As ficou na faixa de 80 a 400 ng g⁻¹, dos quais 50 a 90% correspondem a iAs.

Ainda no contexto de produtos sólidos e líquidos, tais como o xarope de arroz e bebidas japonesas como o “*Amazake*”, Singnes-Pastor *et al.* (2009) determinaram,

por LC-ICP-MS com troca de íons, iAs e DMA em 20 diferentes amostras. Para essa finalidade, aproximadamente 0,5 g da amostra original foram misturados a 10 mL de HNO₃ 1% (v v⁻¹) e deixados em repouso por uma noite. Posteriormente, as misturas foram submetidas à MAE por 50 min à temperatura crescente até atingir 95 °C. A soma das espécies de As foi comparada com os As total determinado por ICP-MS após preparo por MAD. Novamente, foi observado predomínio de iAs.

Como visto nos estudos, apesar de um predomínio dos métodos de extração convencionais, relativamente morosos e ambientalmente desfavoráveis, alguns autores optaram pela simples diluição das amostras. Além disso, em algumas etapas dos métodos, é citado o uso de liofilização ou evaporação dos extratos.

Diferentemente dos procedimentos de evaporação, que geralmente são feitos à pressão atmosférica e temperatura próxima ao ponto de ebulição dos solventes, a liofilização é um processo que visa a eliminação de solventes em condições mais baixas de pressão e temperatura, possibilitando que o solvente previamente congelado passe diretamente ao estado gasoso, por sublimação. Dessa forma, espera-se obter um produto seco, de aspecto poroso, com caráter denominado líófilo. Esse produto será ávido pela água, o que possibilita sua rápida reconstituição. Sendo assim, esse processo pode ser aplicado em alimentos lácteos (KING, 1971; YAMAGUCHI *et al.*, 2017).

Muito aplicada na indústria de alimentos, as etapas de um processo de liofilização consistem em congelar as amostras (abaixo de -18 °C, abaixo do ponto triplo da água), para se evitar a formação de espumas, quando da aplicação de vácuo. A seguir, ocorre a sublimação sob vácuo em um equipamento liofilizador, na medida em que a temperatura do meio retorna à temperatura ambiente. Dessa forma, as substâncias teoricamente não sofrem modificações (KING, 1971; RATTI, 2001). Estudos mostram aplicações variadas da liofilização na conservação de propriedades físico-químicas de alimentos líquidos, tais como leite bovino (MARTINS *et al.*, 2011) e sucos de laranja (KOROISHI, 2005).

Apesar dos possíveis benefícios da liofilização e evaporação de amostras, elas tendem a serem morosas (RATTI, 2001). Por esse motivo, alguns métodos novos de extração (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008; MAJORS, 2014; OEDIT *et al.*, 2016; WUETHRICH *et al.*, 2017), envolvendo o auxílio de campos elétricos e membranas, têm tido êxito na separação de substâncias.

A adaptação de potenciais elétricos a técnicas de extração já consolidadas, tais como SPE, SPME, LLE e extração através de membrana (EME) ainda é relativamente recente e, por isso, ainda pouco explorada. No entanto, benefícios como sensibilidade, seletividade e, sobretudo, velocidade de extração, podem levar os métodos clássicos de extração a outra importante dimensão. Com base nos princípios da eletromigração, comum nas técnicas de eletroforese, a aplicação de potenciais elétricos nas extrações dá origem a um novo campo de preparo de amostras que, por alguns estudos já realizados, começa a ser denominado genericamente como eletroextração (MAJORS, 2014).

Nesse sentido, a eletroextração se aplica à separação de espécies iônicas ou ionizáveis, através de ajuste do pH ou derivatização a fim de que, por ação de um campo elétrico, essas espécies sejam forçadas a ultrapassar barreiras físico-químicas, deixando para trás matrizes e impurezas indesejáveis. Isso é desejável, visto que em um método de preparo de amostra deve-se considerar efeitos de matriz na análise. Assim, a eletroextração visa o transporte dos analitos a um meio compatível com a técnica instrumental escolhida, livre de interferências e, se possível, viabilizando o aumento da concentração das espécies para melhora do LD e LQ (CAMPOS *et al.*, 2015; MAJORS, 2014).

Alguns princípios e sistemas de eletroextração são citados a seguir (GJELSTAD e PEDERSEN-BJERGAARD, 2011; MAJORS, 2014):

- a) Eletroextração líquido-líquido (E-LLE): Neste caso, há uma primeira possibilidade com sistemas bifásicos, em que uma fase aquosa e uma fase orgânica são colocadas em contato e, ao lado de cada fase, são colocados eletrodos com cargas opostas, fazendo com que ocorra uma eletromigração dos íons de cargas opostas na direção dos eletrodos (Figura 3a). Além desse, há os sistemas trifásicos, nos quais os dois eletrodos ocupam posições nas fases externas, fazendo migrar as espécies com cargas opostas para as fases contendo os eletrodos, enquanto as espécies neutras concentram-se na fase central. Neste caso, os sistemas evoluíram à denominada eletroextração trifásica, em que são usados aparatos que envolvem uma fase aquosa doadora em contato com um filtro orgânico intermediário imiscível, seguida por outra fase aquosa, denominada receptora. Há um eletrodo em contato com cada fase aquosa e, na receptora, há um o eletrodo de carga oposta a dos analitos (Figura 3b). Isso

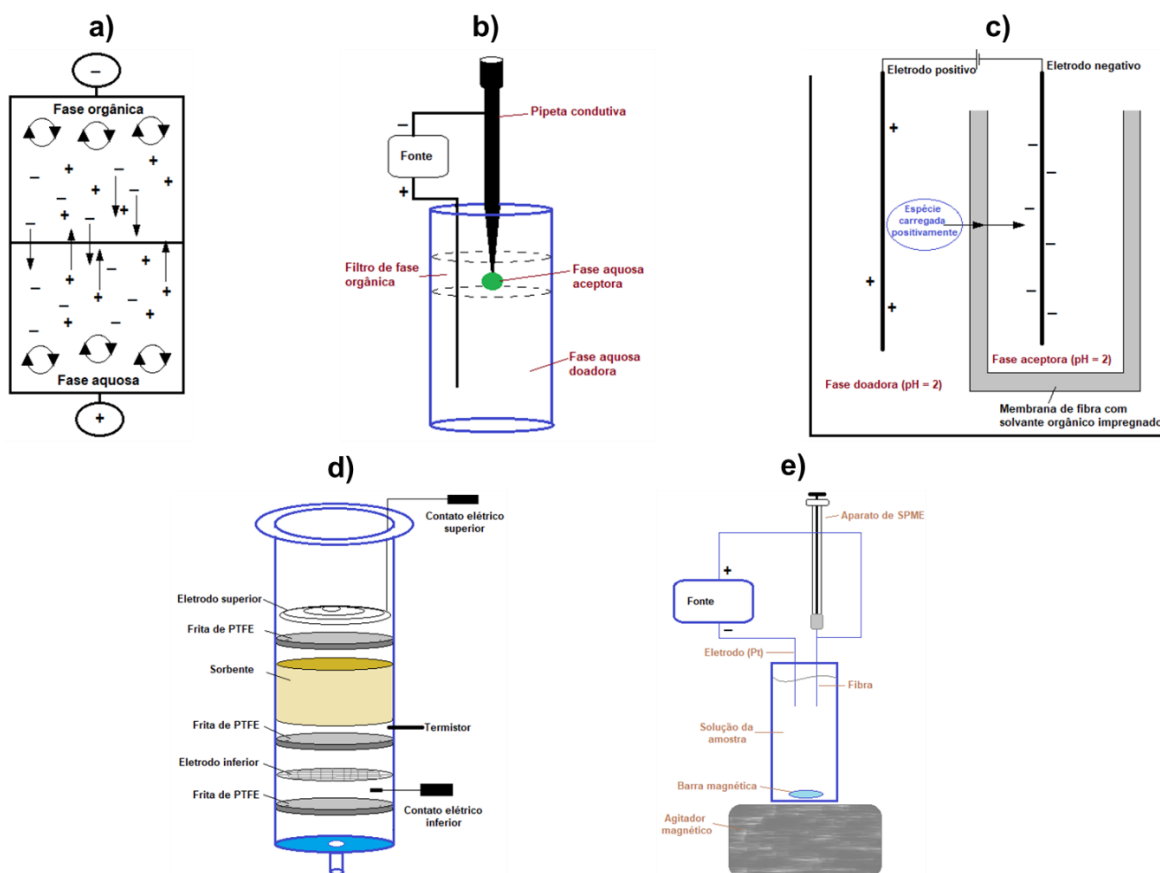
é similar à denominada eletroextração através de membrana (EME). Cabe salientar que, nos meios aquosos, a velocidade de eletromigração tende a ser menor que em meio orgânico, a qual, por ser menos condutora, sofre maior influência do campo elétrico. Empregando-se frascos cônicos de polipropileno ou aparatos de eletroforese capilar, esse procedimento já foi utilizado para a separação de peptídeos e aminoácidos em amostras biológicas.

- b) EME: Empregada pela primeira vez para isolar drogas alcalinas em meio acidificado a partir de amostras de água, plasma sanguíneo e urina humana, similar a uma extração líquido-líquido-líquido, ocorreu a eletroextração com um solvente suportado em uma membrana sólida (SLM). O solvente foi o 2-nitro-fenil-octil éter, o qual foi suportado nos poros de uma membrana sólida, posicionada entre as fases aquosas doadora e aceptora, contendo eletrodos de platina, com uma diferença de potencial aplicada de 300 V (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2006). Os líquidos podem ser suportados tanto em membranas, quanto em fibras ocas (Figura 3c) (EIBAK *et al.*, 2010). Na EME o potencial elétrico aplicado nos eletrodos inseridos diretamente nos líquidos é a força motriz para a extração e esse parâmetro deve ser otimizado. Eibak *et al.* (2010) mostraram que as recuperações dos analitos foram proporcionais ao aumento da diferença de potencial aplicado até certo valor. A voltagem é dependente principalmente do tipo de analito e da composição da membrana. São reportados potenciais de 5 a 100 V, criando um campo elétrico sobre a SLM. Dessa forma, para analitos ácidos, com a SLM normalmente suportada em 1-octanol, o ânodo (eletrodo positivo) é posicionado na fase receptora e o cátodo na fase doadora. Para facilitar o processo de eletromigração, à amostra contida na fase doadora pode ser adicionado hidróxido de sódio ou de amônio, para aumento das cargas negativas nos analitos. Para analitos alcalinos, o sistema invertido. Cabe destacar que a EME é mais rápida que a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME), porque na EME a diferença de potencial é a força motriz da extração, em vez do gradiente de pH. Normalmente, com a EME é possível prover uma extração completa em apenas 5 min.
- c) Eletroextração em fase sólida (E-SPE): Os benefícios da SPE e seus mecanismos são amplamente conhecidos. Nesse sentido, pesquisadores

adaptaram um sistema de SPE para eletroextração, tal como apresentado na Figura 3d. Em estudo realizado por Orlando *et al.* (2014), foram relatados imprevistos em sua aplicação, tais como eletrólise da água e consequente alteração de pH em sistemas não tamponados. No entanto, nas melhores condições (otimizadas) houve melhoras significativas em relação à SPE convencional.

- d) Microextração em fase sólida por eletroestimulação (EE-SPME): Os princípios da SPME também já são amplamente conhecidos. Nesse sentido, pesquisadores tem buscado a melhora de sensibilidade e seletividade a partir da aplicação de potencial elétrico nas fibras comerciais. As fibras já foram usadas com a imersão direta das mesmas em amostras aquosas para a extração de meta-anfetaminas, mediante o aparato apresentado na Figura 3e (TAN *et al.*, 2013).

Figura 3 – Exemplos de aparatos utilizados na (a) Eletroextração líquido-líquido; (b) Eletroextração trifásica; (c) EME; (d) E-SPE e (e) EE-SPME.



Fonte: Adaptado (a-b) (MAJORS, 2014); (c) (EIBAK *et al.*, 2010); (d) (ORLANDO *et al.*, 2014) e (e) (TAN *et al.*, 2013).

Quando relacionado mais diretamente com a EME, percebe-se que seu uso tem se intensificado para amostras como plasma sanguíneo e leite. Nos estudos relacionados com essas amostras, de acordo com Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2008), em sua revisão sobre eletroextrações, recuperações de 8 a 100% dos analitos aniônicos tem sido alcançadas em alguns minutos de aplicação de potenciais elétricos com o emprego de 1-octanol sobre a SLM, somado a 15% di-(2-etilhexil) fosfato (DEHP) como agente de par iônico, para melhorar a condução das espécies através da membrana. Ainda, foi demonstrado em outro estudo conduzido por esses autores, que o fluxo dos íons (J_i) através da SLM pode ser regido pela Equação 1.

Equação 1 - Fluxo de íons (J_i) através da SLM, onde D_i é o coeficiente de difusão do íon, h é a espessura da SLM, v é a grandeza adimensional da força motriz, X é a razão entre as concentrações de íons na fase doadora e a fase aceptora (balanço de íons), $c_{i_h}^I$ e $c_{i_0}^I$ são as concentrações dos íons de interesse na fase doadora e na fase receptora nas interfaces com a SLM, respectivamente.

$$J_i = \frac{-D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln X} \right) \left(\frac{X-1}{X - \exp(-v)} (c_{i_h}^I - c_{i_0}^I \exp(-v)) \right)$$

Fonte: (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008)

A grandeza adimensional da força motriz (v) pode ser dimensionada, sendo diretamente proporcional à carga do íon e inversamente proporcional à temperatura, o que demonstra que tanto maior será a força motriz dos íons, quanto maior a sua carga iônica e em menores temperaturas (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008).

Sendo assim, muitos estudos têm dado ênfase em metodologias limpas de eletroextração (OEDIT *et al.*, 2016; WUETHRICH *et al.*, 2017). Nesse sentido, Silva *et al.* (2016) separaram substâncias antibióticas em leite bovino, empregando um sistema desenvolvido em laboratório, denominado como dispersão de matriz em fase sólida assistida por campo elétrico (E-MSPD), seguido por separação e determinação por LC-MS/MS. Para aprimoramento das condições de extração, os autores otimizaram condições como a composição do eluente, o pH do eluente, o potencial elétrico aplicado e a polaridade do meio.

Lindenburt *et al.* (2012) avaliaram a E-LLE para separarem acilcarnitinas em urina. Cabe salientar aqui a versatilidade das técnicas de eletroextração, que podem funcionar tanto para extração, quanto para acoplamento com LC ou com eletroforese capilar de zona (CZE). Os autores ainda destacam a possibilidade de pré-

concentração do analito. Também, em estudo sobre acilcarnitinas, porém em plasma sanguíneo, Raterink *et al.* (2013) adaptaram um sistema E-LLE trifásico, mostrando que, além dos potenciais aplicados, a composição da fase orgânica (filtro orgânico) interfere na seletividade da extração. Um aparato similar foi desenvolvido por Wuethrich *et al.* (2015) para a extração tanto de espécies aniônicas quanto catiônicas de herbicidas em amostras de água. Assim como esses autores, todos os demais citados destacam a simplicidade, economicidade, rapidez, versatilidade e baixa ou nenhuma geração de resíduos como pontos extremamente positivos da eletroextração.

É possível enfatizar que em quase todos os estudos mencionados, foram empregados eletrodos compostos de platina, com adaptações conforme a técnica de extração. As potencialidades do emprego de potenciais elétricos como força motriz são evidentes para extrações mais eficientes, com menor gasto de recursos, solventes e tempo. Trata-se, portanto, de um importante e novo caminho para o preparo de amostras para análises por cromatografia (CAMPOS *et al.*, 2015; GJELSTAD e PEDERSEN-BJERGAARD, 2011; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008; WUETHRICH *et al.*, 2016), dentre elas, LC com coluna de troca iônica para as análises de especiação de As quando acoplada a ICP-MS, visto que estão associadas à separação de íons.

Dessa forma, todos os estudos de eletroextração supramencionados relacionam-se ao preparo de amostras para posterior determinação de compostos orgânicos, por LC, CZE ou GC. Sendo assim, por essa versatilidade amplamente destacada, sua associação a técnicas de separação e determinação, visando-se análises de especiação, pode ser uma nova área de estudos no ramo da Química Analítica. Contudo, independentemente do procedimento de preparo de amostras, fica claro que este deve ser previamente planejado para que seja compatível com as técnicas instrumentais de separação e determinação que serão utilizadas para a análise de especiação (CORNELIS *et al.*, 2004).

2.4.2 Técnicas instrumentais para análise de especiação de As

Os métodos desenvolvidos para análise de especiação combinam técnicas cromatográficas, espectrométricas e eletroquímicas (TERLECKA, 2005). Dentre as

técnicas instrumentais empregadas visando-se a análise de especiação de As, destacam-se as separações por cromatografia acopladas a técnicas de determinação com alta sensibilidade e seletividade. A LC é a mais comum, enquanto que a GC, a cromatografia em fluído supercrítico (SFC) e a eletroforese capilar (CE) surgem como opções em segundo plano. Nesse sentido, na separação por LC, conforme a forma de separação, os princípios envolvidos são os que seguem (B'HYMER e CARUSO, 2004; GONG *et al.*, 2002):

- a) IC: é baseada no mecanismo de interação de ânions ou cátions com a fase estacionária presente na coluna utilizada. Desse modo, quando o mecanismo é a troca catiônica, há a separação de espécies como AsC, AsB, óxido de trimetilarsina (TMAO) e tetrametilarsênio (Me_4As^+). Enquanto isso, quando o mecanismo é a troca aniônica, há a separação de espécies como As(III), As(V), DMA e MMA. Neste último caso, convém destacar que um dos tipos de coluna analítica mais utilizada é a polimérica *Hamilton PRP-X100*, em função da sua pronunciada estabilidade em uma ampla faixa de pH (1 até 13), o que lhe confere grande versatilidade em análise de especiação de As.
- b) Cromatografia de pareamento iônico (IPC): são empregados, geralmente, colunas de fase reversa ou apolar. Destinam-se à separação das espécies As(III), DMA, MMA e As(V), empregando-se reagente catiônico para pareamento iônico junto a essas espécies. O tetrabutilamônio (TBA) é o reagente comumente utilizado para a formação do par iônico.
- c) Cromatografia de exclusão: envolve o emprego de colunas contendo resinas de troca iônica, que possibilitam a separação de espécies ionizadas e neutras, tais como As(III), DMA, MMA, As(V) e AsB. Um exemplo dessas resinas é a de metilacrilato carboxilada.

As técnicas de separação devem ser acopladas a técnicas instrumentais seletivas e sensíveis que viabilizem análises rápidas, prevenindo assim a conversão das espécies de As. Nesse sentido, a ICP-MS é uma importante técnica de detecção deste elemento, com grande sensibilidade e a facilidade de hifenação com técnicas de separação, tais como LC. Portanto, a combinação de LC com ICP-MS pode permitir excelente seletividade e sensibilidade para a determinação das espécies de As. Adicionalmente, LC-ICP-MS viabiliza grande faixa linear de resposta e a medida de

razões isotópicas, quando necessário (AMMANN, 2011; B'HYMER e CARUSO, 2004; GONG *et al.*, 2002; MICHALKE, 2002).

A cromatografia à líquido por troca de íons acoplada a ICP-MS oferece vantagens significativas para a análise de especiação de As, sobretudo, no que tange à especificidade, seletividade e sensibilidade (ao nível de ng g^{-1}). Isso implica na obtenção de baixos LDs para as espécies de As, em amostras biológicas e ambientais, sem a necessidade de etapas de derivatização ou pré-concentração. A força iônica do soluto, a temperatura, o pH, a força iônica, a concentração e a vazão da fase móvel podem influenciar na separação dos analitos. Outro fator avaliável é a adição de modificadores orgânicos junto a esta fase móvel, tais como o metanol (B'HYMER e CARUSO, 2004).

Diversos trabalhos tem sido conduzidos mediante utilização da LC-ICP-MS por troca de íons para a análise de especiação de As, como já mencionado. São trabalhos como o de Heitkemper *et al.* (2001), que empregaram ICP-MS para a determinação de As total após decomposição ácida das amostras de arroz assistida por micro-ondas, para a posterior comparação da concentração encontrada com a soma das espécies de iAs, DMA, MMA e AsB determinados por LC-ICP-MS, em que foi utilizada uma coluna de troca aniônica *Hamilton PRP-X100*. Uma mistura de fosfato e nitrato de amônio foi utilizada como fase móvel, ambos com concentração de 10 mmol L^{-1} e em pH de 6,3.

A maioria dos estudos voltados à análise especiação de As, tanto em arroz, quanto em seu derivados, dedicam-se à determinação das espécies de iAs (As(III) e As(V)) e orgânico (DMA e MMA) por LC-ICP-MS empregando colunas de troca aniônica (ARAO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2012; MEHARG *et al.*, 2008b; NOGUEIRA *et al.*, 2018; SANZ *et al.*, 2005; SANZ *et al.*, 2007; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2009; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2016; SON *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2005; ZAVALA *et al.*, 2008). Nesses estudos, boa parte das análises foram feitas mediante colunas de troca aniônica *Hamilton PRP-X100* e com o emprego de soluções de fosfato de amônio 1 a 20 mmol L^{-1} e pH de 6 a 8 como fase móvel (CHEN *et al.*, 2018; SANZ *et al.*, 2005; SANZ *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2005). Nessa faixa de pH, ânions das espécies DMA, MMA e As(V) com diferentes intensidades de carga são formados, enquanto que o As(III) somente forma espécies carregadas em pH acima de 9. Dentre esses estudos, destaca-se o de Sanz *et al.* (2005) que fez análise de especiação de As(III), As(V), DMA e MMA em extratos

enzimáticos de arroz, com uma coluna *Hamilton* PRP-X100 e solução de fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} em pH 6,0 como fase móvel, à vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. No referido estudo, houve excelente separação das quatro espécies, eluindo, nesta ordem, As(III), DMA, MMA e As(V), com ótima sensibilidade.

B'Hymer e Caruso (2004) relatam em sua importante revisão sobre especiação de As mediante LC-ICP-MS que a principal interferência é causada pelo cloro que, em conjunto com o argônio do plasma forma o íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Este, por possuir a mesma razão massa carga do As, interfere no sinal do único isótopo do elemento (m/z 75). Sendo assim, para controle desta interferência, pode-se monitorar a presença de cloro nas amostras pela sua determinação em separado e, se necessário, pode-se medir a razão massa carga 77, que corresponde ao íon poliatômico do outro isótopo do cloro ($^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$) e desta forma a interferência pode ser corrigida matematicamente. Complementarmente, esses autores ainda destacam que mediante as otimizações das condições cromatográficas pode-se reduzir ou até eliminar a interferência do cloro. Uma alternativa nesse sentido, pode ser o emprego de solução tampão de carbonato de amônio como fase móvel, a fim de que o cloreto elua após as espécies de As. Além disso, podem ser usados equipamentos de ICP-MS com celas de reação/colisão, ou até instrumentos de alta resolução.

Além do já conhecido e eficiente acoplamento de LC-ICP-MS para a análise de especiação, outras técnicas instrumentais e acoplamentos tem sido reportados. Assim sendo, para a determinação do As, as técnicas espectrométricas, tais como ultravioleta e visível (UV-Vis), OES, absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS), HG-AAS, HG-AFS e HG-ICP-MS tem sido utilizadas em diferentes estudos de análise de especiação de As, quando possível hifenadas a técnicas cromatográficas de separação, tais como as já mencionadas nesta revisão (AMARAL *et al.*, 2013; JAIN e ALI, 2000; TERLECKA, 2005).

Feldmann *et al.*(1999) empregaram separação cromatográfica por pareamento iônico seguida de determinação das espécies por geração de hidretos acoplada a fluorescência atômica (IPC-HG-AFS), para comparação com os resultados obtidos por LC-ICP-MS empregando uma coluna de troca aniônica *Hamilton* PRP-X100 e fosfato 50 mmol L^{-1} em pH 6,00 como fase móvel.

Chaney *et al.* (2018) determinaram as espécies de As inorgânico a partir de extratos de arroz por HG-ICP OES. Em amostras de cerveja, Herce-Pagliai *et al.*(1999) determinaram iAs, DMA e MMA por IC-HG-AAS. A partir de bebidas

alcoólicas, tais como cerveja e vinho, Campillo *et al.* (2008) determinaram as mesmas espécies após derivatização, mediante separação por GC seguida pela determinação por OES com fonte de plasma induzido por micro-ondas. Por sua vez, Yuan *et al.* (2005) determinaram em extratos de arroz As(III), As(V), DMA e MMA por IC-HG-AFS.

Desse modo, a partir da identificação e determinação das espécies, em praticamente todos os estudos supracitados, faz-se necessário o emprego de métodos para a determinação de As total, a fim de que a soma das espécies seja comparada a este valor. Várias metodologias podem viabilizar a determinação de As total em baixas concentrações e com boa seletividade. Entre as comumente vistas nos estudos desse tipo, destacam-se a GF-AAS, HG-AFS e a ICP-MS, geralmente precedidas por decomposição ácida assistida por aquecimento eletrotérmico ou por micro-ondas. Essas combinações tendem a aliar características desejáveis como sensibilidade da técnica de determinação somada à eliminação de efeitos de matriz, viabilizados pelo de preparo das amostras oxidante (B'HYMER e CARUSO, 2004; MOREIRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2007).

2.5 LEGISLAÇÃO SOBRE As EM ARROZ E DERIVADOS

Como mencionado, o iAs pode causar intoxicações agudas e doenças graves. Além disso, a exposição crônica a este elemento por longo período pode levar às denominadas arsenicoses. Os efeitos dependem do nível de exposição e podem incluir lesões na pele, neuropatias periféricas, distúrbios gastrointestinais, diabetes, problemas renais, doenças cardiovasculares e câncer. Por esse motivo, em 2010, o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da OMS (*WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) da Organização Conjunta de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (*Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) estipulou que a dose semanal tolerável provisória (PTWI) de ingestão de iAs é de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, o que equivale a um máximo de 2,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por dia (IARC, 1987).

Em relação ao arroz, atualmente a Comissão de Códigos Alimentares (*Codex Alimentarius Commission*) recomenda que o nível de As total no arroz branco polido não exceda 0,2 mg kg^{-1} (FAO, 2014). Desse modo, como a transferência de As para o leite de arroz é possível, em junho de 2015, a Comissão Européia (EC) publicou a

Regulação 2015/2016, anexa à Regulação 1881/2006, definindo a concentração de 0,10 mg kg⁻¹ como o nível máximo de iAs que pode estar presente no arroz utilizado para a produção de alimentos destinados a crianças e lactantes (EC, 2015). No entanto, apesar do progresso em estabelecer limites máximos para iAs, o que reforça a importância da análise de especiação de As, ainda não há valores estabelecidos para bebidas derivadas do arroz, tais como leite, cerveja, saquê e para condimentos líquidos derivados de arroz, como o vinagre. Por isso, a maioria dos estudos voltados à análise de especiação de As nessas bebidas, referem-se ao limite de As total para água potável (10 µg L⁻¹) como valor de referência (HUANG *et al.*, 2012; MEHARG *et al.*, 2008a; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2009).

No Brasil, as regulamentações dos níveis máximos de contaminantes inorgânicos, dentre os quais o As, são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, a partir da Resolução - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, que incorpora ao ordenamento jurídico nacional a Resolução GMC MERCOSUL nº 12/2011. Nessa resolução, são estabelecidos os valores apresentados na Tabela 1, para arroz e alguns tipos de bebidas com alguma similaridade às supramencionadas, com base no arroz (ANVISA, 2013).

Tabela 2 - Limites de As para bebidas e alimentos com base na Resolução RDC nº 42/2013.

Categoria	Limite máximo (mg kg⁻¹)
Bebidas analcoólicas (excluídos os sucos)	0,05
Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho	0,10
Vinho	0,20*
Arroz e seus derivados, exceto óleo	0,30
Leite fluido pronto para o consumo e produtos lácteos sem adição, sem diluir nem concentrar	0,05

* Para o vinho, o valor de referência é dado em mg L⁻¹.

Fonte: (ANVISA, 2013).

Desse modo, as legislações europeias são mais restritivas ao iAs, tendo em vista a toxicidade muito maior das espécies inorgânicas desse elemento. Isso corrobora a necessidade de desenvolverem-se cada vez mais métodos de análise de especiação de As que possam ser usados em análise de rotina.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo o desenvolvimento de métodos de análise de especiação de As em derivados líquidos do arroz, tais como leite, cerveja, saquê e vinagre. Serão desenvolvidos e discutidos quatro métodos de preparo das amostras para a posterior determinação das espécies As(III), DMA, MMA e As(V) por LC-ICP-MS com coluna de troca iônica. As características analíticas do método, serão definidas pelo LD, LQ e exatidão. Esta será avaliada por ensaios de recuperação do analito e pela comparação do resultado da soma das espécies de As nas amostras, com a quantidade de As total determinado por ICP-MS, após decomposição das amostras por MAD. As principais motivações para o estudo devem-se aos poucos estudos realizados sobre análise de especiação de As em derivados líquidos de arroz, a possibilidade de transferência das espécies deste elemento presentes no arroz para seus derivados líquidos, a ausência de legislação específica para as espécies de As nesses tipos de derivados. Por fim, pretende-se que o método desenvolvido possa ser proposto às agências reguladoras tanto brasileiras quanto estrangeiras.

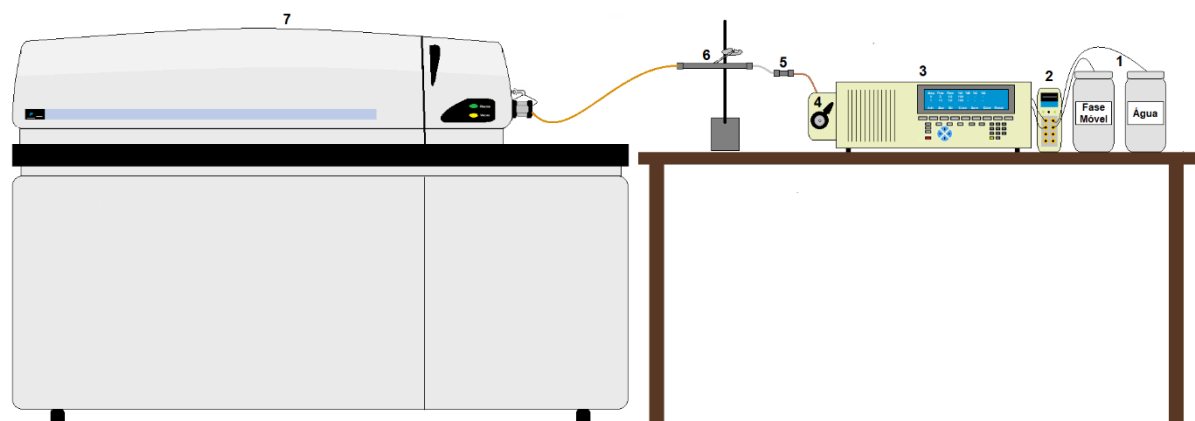
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer SCIEX, modelo ELAN DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, USA), equipado com nebulizador pneumático (Meinhard tipo A, <http://www.meinhard.com>, USA) ajustado a uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., <http://www.geicp.com>, Austrália) foi utilizado para a determinação de As total. Para a geração do plasma foi utilizado argônio 99,998% de pureza (White Martins, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil).

A separação das espécies de As foi realizada em um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para cromatografia à líquido de alta pressão (PerkinElmer, modelo Series 200 LC Pump), um degaseificador à vácuo (PerkinElmer, modelo Series 200 Vacuum Degasser), uma coluna de guarda (Hamilton, com partículas de 10 μm , <https://www.hamiltoncompany.com>, Suíça) e uma coluna de troca aniônica (Hamilton, com partículas de 10 μm). Na Figura 4 é mostrado um esquema do sistema utilizado.

Figura 4 – Esquema do sistema de LC-ICP-MS utilizado no trabalho. 1) Fase móvel; 2) Degaseificador a vácuo; 3) Bomba de HPLC; 4) Injetor; 5) Coluna guarda (troca aniônica); 6) Coluna analítica (troca aniônica) e 7) Instrumento de ICP-MS.



Fonte: Autor.

Para a caracterização dos derivados líquidos analisados, foram medidos outros elementos por ICP-MS e/ou através de um espectrômetro de emissão ótica com

plasma indutivamente acoplado (Spectro, modelo Ciro, <http://www.spectro.com, USA>) equipado com nebulizador de fluxo cruzado (cross flow) e câmara de nebulização de duplo passo, confeccionada em quartzo, cujos isótopos e linhas espectrais medidos estão apresentados na Tabela 3.

A evaporação das amostras foi feita em um banho termostaticado (IKA®, modelo HB 05.06 CN, <http://www.ika.net>, China) e a liofilização foi em um liofilizador (Terroni, modelo LH400/4F, <http://www.terroni.com.br>, Brasil).

Para a eletroextração, visando a análise de especiação de As por LC-ICP-MS, foi desenvolvido um sistema de eletroextração através de membrana com eletrodos conectados a uma fonte de corrente contínua controlável, usada para eletroforese (10 a 600 V, Loccus, modelo LPS 600V, <http://www.loccus.com.br>, Brasil). Foram testados eletrodos de tungstênio e de platina de alta pureza. O sistema de eletroextração foi desenvolvido no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da UFSM.

Para o preparo das amostras mediante MAD, para a posterior determinação de As total e dos outros elementos, foi utilizado um equipamento de micro-ondas em sistema fechado (Milestone, modelo Ultrawave, <https://www.milestone.com>, Itália) equipado com sistema de câmara de reação única (SRC), com *rack* para 15 frascos de quartzo, com capacidade para conter 15 mL.

As condições instrumentais selecionadas para a determinação de As total e para a análise de especiação de As são apresentadas resumidamente na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições instrumentais empregadas para a determinação de As total e para a análise de especiação de As.

(continua)

MAD	Condições
Pressão inicial do sistema (Ar), bar	40
Tempo de rampa até 230 °C, min	10
Tempo de aquecimento (230 °C), min	20
Determinações por ICP OES	
Potência RF, W	1500
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	12,0
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,95
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	1,12

Tabela 3 – Condições instrumentais empregadas para a determinação de As total e para a análise de especiação de As.

(conclusão)

Determinações por ICP OES	Condições
Vazão da amostra, mL min ⁻¹	1,20
Comprimento de onda, nm	Ag (328,068), Al (167,078), B (249,773), Ba (455,404), Be (313,042), Ca (393,366), Cd (214,438), Co (230,786), Cr (267,716), Cu (327,396), Fe (259,941), K (766,491), La (379,478), Li (670,780), Mg (280,270), Mn (257,611), Mo (203,844), Na (588,995), Ni (231,604), P (177,495), Pb (168,215), S (192,034), Sb (231,147), Se (196,090), Sr (407,771), Ti (334,941), V (309,311) e Zn (213,856)
Determinações por ICP-MS	
Potência RF, W	1300
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1.2
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	1.10
Cones (Sampler e Skimmer)	Pt
m/z monitorada para cada elemento	⁷⁵ As, ¹⁰⁹ Ag, ¹³⁸ Ba, ²⁰⁹ Bi, ¹¹⁴ Cd, ⁵⁹ Co, ⁵³ Cr, ⁶³ Cu, ⁵⁵ Mn, ⁹⁸ Mo, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁸ Pb, ¹²¹ Sb, ¹²⁰ Sn, ⁸⁶ Sr, ⁵¹ V, ⁶⁶ Zn, ³⁵ Cl e ³⁷ Cl
<i>Sweeps (ou varreduras)</i>	500 para IC-ICP-MS
Leituras por replicata	500 para IC-ICP-MS
Replicatas	3 (500 para IC-ICP-MS)
<i>Dwell time</i> , ms	25 (500 para IC-ICP-MS)
Especiação de As por LC-ICP-MS	
Coluna guarda	PRP-X100 (30 x 2,1 mm)
Coluna analítica	PRP-X100 (250 x 4,1 mm)
Volume de amostra, µL	200
Injetor	Manual

Fonte: Autor.

A água utilizada para preparar todas as soluções e amostras foi previamente destilada, deionizada em uma coluna trocadora de íons e em seguida purificada por osmose reversa em um sistema de obtenção de água de alta pureza (Milli-Q, Millipore, <http://www.millipore.com>, USA), até resistividade máxima de 18,2 M Ω cm. O HNO₃ utilizado foi previamente destilado em um sistema de quartzo para a destilação de ácidos abaixo do ponto de ebulição (*Sub-boiling*, Milestone, modelo duoPUR).

Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro (Metrohm, modelo 781 pH/Ion Meter, <http://www.metrohm.com>, Suíça), com resolução de 0,01 unidades de pH, equipado com eletrodo de vidro combinado e sensor de temperatura.

4.2 REAGENTES

Foram preparadas soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de As, a partir da dissolução do ácido dimetilarsínico (DMA, Sigma-Aldrich, <http://www.sigma.com>, USA), ácido monometilarsônico (MMA, Sigma-Aldrich), arsenito (As(III), Riedel-de Haën, <http://www.riedelhaen.com>, Alemanha) e arsenato (As(V), Riedel-de Haën) em água. Para otimização do sistema LC-ICP-MS e para a calibração, visando a posterior determinação das espécies de As, foram preparadas soluções de referência contendo as quatro espécies de interesse, a partir da diluição em água ultrapura e em soluções das fases móveis avaliadas a cada dia de trabalho.

Para a determinação das concentrações de As total e dos demais elementos por ICP OES e/ou ICP-MS, a partir de solução estoque multielementar (SCP 33MS, SCP Science, PlasmaCAL, Canadá), foram preparadas as soluções de calibração, com 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag, Al, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sn, Sr, Ti V e Zn em HNO₃ 5% (v/v). Para a determinação da concentração de cloro, por ICP-MS, foram preparadas soluções de calibração com 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ de cloro, pela diluição de uma solução 1000 mg L⁻¹ de NaCl (Merck, Alemanha) em 10 mmol L⁻¹ de NH₄OH.

Na decomposição das amostras por MAD foi empregado HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ (Merck, Alemanha), previamente destilado em sistema *sub-boiling* para redução de impurezas.

O preparo da fase móvel de monohidrogenofosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄, Merck) foi executado pela dissolução do sal em água, a fim de se obter as

concentrações testadas, que foram 7,0, 9,0 e 11,0 mmol L⁻¹. O ajuste de pH foi realizado pela a adição controlada de HNO₃ ou de NH₄OH (Sigma-Aldrich), ambas a 5% (v v⁻¹). Da mesma forma, procedeu-se com a solução da fase móvel de carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃, Merck), quando foram preparadas soluções contendo 9,0 e 30,0 mmol L⁻¹ do sal.

Para a eletroextração através de membrana foi empregada, entre as fases aquosas aceptora e doadora, uma membrana polimérica porosa (20 µm) de polietileno, retirada de um sistema de SPE (Sigma-Aldrich, modelo 54222-U Supelco), embebida com 60 µL de 1-octanol com pureza superior a 99% (Sigma-Aldrich) ou etanol com pureza superior a 99,5% (Sigma-Aldrich).

Para os testes de simulação da matriz, junto às soluções das espécies de As foi utilizado etanol com pureza superior a 99,5% (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial com pureza superior a 99,7% (Vetec, <http://www.sigmaaldrich.com/us-export/vetec-quimica>, Brasil) e metanol com pureza mínima de 99% (Carlo Erba, <http://www.carloerbagenti.com>, Itália). Este metanol também foi utilizado junto com a fase móvel nos estudos realizados para avaliar a influência deste solvente.

Todos os frascos e materiais utilizados no trabalho foram devidamente descontaminados durante 48 horas por imersão em ácido nítrico (Merck) diluído em água a uma concentração de 20% (v v⁻¹).

4.3 MATERIAIS DIVERSOS

Um sistema trifásico de eletroextração foi avaliado, envolvendo EME, o qual foi confeccionado em vidro no laboratório de Hialotecnica previamente mencionado.

Frascos de polipropileno com capacidades de 15 e 50 mL (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha) foram utilizados para armazenamento e diluição das amostras e soluções.

A injeção das soluções no cromatógrafo foi realizada com a utilização de uma seringa com capacidade para 1 mL (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha) e, para algumas amostras, foi utilizado um filtro de acetato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros com 0,45 µm (Alltech, <http://www.alltech.nl>, Holanda), sendo posicionado entre a seringa e a agulha.

As pesagens foram executadas em uma balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Shimadzu, modelo AY 220, <http://www.shimadzu.com>, Japão).

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado mediante o programa *Graph Pad Software, Inc. (Insttat 2.1)* e o processamento dos picos cromatográficos foi realizado considerando-se as áreas integradas através dos programas *WINFAAS (EUA)* e *ORIGIN 8.0 (EUA)*.

4.4 AMOSTRAS

Neste trabalho foram analisados três tipos de amostras líquidas originadas do grão de arroz, divididas em alcoólicas, não alcoólicas e ácidas. As alcoólicas foram uma amostra de saquê e treze amostras de cerveja (identificadas de I a XIII), sendo que no rótulo de algumas delas não consta o arroz na sua composição. Como representante das ácidas, foi analisada uma amostra de vinagre de arroz e as não alcoólicas foram duas amostras de leite de arroz, sendo uma delas de arroz branco e a outra de arroz integral. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados do Rio Grande do Sul.

O saquê analisado foi produzido no Brasil e possuía teor de etanol estimado em 15,5% (v v⁻¹). As cervejas foram fabricadas em diferentes países e possuíam teor médio informado de 4,5% (v v⁻¹) de etanol. O vinagre, por sua vez, também fabricado no Brasil, continha 4,2% (m v⁻¹) de ácido acético. Os leites de arroz, fabricados na Itália, continham água, 17% de arroz, óleo de semente de girassol prensado a frio e sal, conforme as informações constantes nos rótulos. A diferença fundamental entre os dois tipos de leite era o tipo de arroz, sendo um deles proveniente de arroz branco comum e o outro, de arroz integral. Os valores nutricionais informados pelo fabricante do leite seguem na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição informada para as amostras de leite de arroz analisadas no trabalho.

Parâmetro	Valor de referência (100 mL)	
	Integral	Comum
Energia	51 kcal	57 kcal
Ácidos graxos	1,0 g	1,0 g
Carboidratos	10,0 g	12,0 g
Açúcares	5,5 g	5,5 g
Fibras	< 0,5 g	< 0,5 g
Proteínas	0,5 g	< 0,5 g
Sal	0,08 g	0,08 g

Fonte: Rótulo dos produtos.

Para impedir a possível conversão de espécies de As, as embalagens das amostras, depois de abertas, foram devidamente fechadas e as amostras acondicionadas em temperatura em torno de 4 °C, em refrigerador com temperatura controlada.

4.4.1 Preparo das amostras para a determinação de As total e caracterização elementar

Para a determinação de As total e demais elementos, as amostras foram decompostas com ácido em sistema fechado assistido por micro-ondas. Para tal, em triplicata, foram transferidos 2 mL das amostras para os frascos de quartzo que acompanhavam o sistema de digestão. Às alíquotas das amostras de cerveja, vinagre e leite foram adicionados 4 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹. Para a amostra de saquê, a condição anterior causou projeção da amostra. Desta forma, o volume de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ foi reduzido para 3 mL e adicionado mais 1 mL de água. Os brancos analíticos foram preparados sob as mesmas condições das amostras, porém em ausência das mesmas.

Após a adição de HNO₃ e água, quando foi necessário, os frascos foram devidamente fechados e as amostras submetidas às micro-ondas, como apresentado

na Tabela 3. O programa de aquecimento informando na Tabela 3 é sugerido pelo fabricante do sistema.

Após arrefecimento, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno com capacidade de 50 mL, onde foram diluídas em água até 25 mL para posterior determinação dos elementos por ICP OES e ICP-MS.

Para a determinação de cloro por ICP-MS, as amostras foram simplesmente diluídas em água, com fator de diluição adequado.

Convém salientar que, para controle da performance do instrumento de ICP-MS para As total, o material de referência certificado (CRM) de farinha de arroz (*Rice Flour* – NIST SRM 1568b) foi analisado, após 1,0000 g do CRM ser submetido ao mesmo preparo das amostras.

4.4.2 Preparo das amostras para a análise de especiação de As

Os resultados obtidos para as amostras diluídas em fase móvel ou em água foram comparados com os obtidos para as amostras liofilizadas, evaporadas e eletroextraídas.

4.4.2.1 Diluição da amostra

As amostras foram diluídas 1:4 ($v v^{-1}$) em água e na fase móvel, tal como proposto por Huang *et al.* (2012). Nesse sentido, os ensaios foram conduzidos de modo igual para uma amostra de vinagre de arroz e para uma amostra de leite de arroz, assim como para soluções de referência contendo $5,0 \mu g L^{-1}$ de As das quatro espécies (As(III), As(V), MMA e DMA), uma diluída em água e a outra na fase móvel avaliada.

Após encontrar as condições mais adequadas, as amostras foram diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) na fase móvel para a determinação das espécies de As por LC-ICP-MS com coluna de troca iônica. O menor fator de diluição utilizado para as determinações ocorreu para melhorar a detecção das espécies, com o aumento da relação entre pico cromatográfico e linha base para cada espécie.

4.4.2.2 *Evaporação da amostra em temperatura controlada*

Foi feita a evaporação em banho termostaticado com temperatura controlada. Nesse processo, com o objetivo de eliminar interferentes como o etanol e o ácido acético, foram evaporadas alíquotas de 10 mL das amostras de vinagre de arroz, leite de arroz comum e integral, saquê e cerveja (amostras I, II e III). Adicionalmente, alíquotas das amostras foram diluídas na fase móvel fosfato de amônio (proporção 1:2 v v⁻¹). A essas soluções foram adicionadas as quatro espécies com o objetivo de obter concentrações adicionais de 1,0 e 5,0 µg L⁻¹ de As para cada espécie, nos testes de recuperação do analito.

As alíquotas destas amostras amostras foram colocadas em frascos de polipropileno e submetidas a um banho de aquecimento convencional sob temperatura controlada de aproximadamente 75 °C, tendo em vista a proximidade ao ponto de ebulição do etanol (78,37 °C), presente na maioria das amostras estudadas. Sob essa temperatura, as amostras foram aquecidas e mantidas assim ao longo dos dias, por aproximadamente 10 horas por dia. Para evaporação até quase a secura, abaixo de 1 mL nos frascos, foram necessários 15 dias sob aquecimento, totalizando cerca de 150 horas sob evaporação. Após esse tempo, adicionou-se a cada amostra quase seca a fase móvel empregada para a análise de especiação, até o volume de 10 mL e, dessa forma, as referidas amostras foram injetadas no equipamento de LC-ICP-MS, com troca iônica, para a análise de especiação de As.

4.4.2.3 *Liofilização da amostra*

No intuito de minimizar possíveis interferências ocasionadas por etanol e ácido acético, presentes na cerveja, saquê e vinagre, foram transferidos para frascos de polipropileno de 15 mL, previamente descontaminados, alíquotas de 10 mL das amostras (vinagre de arroz, saquê e cervejas I, II e III). Adicionalmente, alíquotas de 10 mL das amostras foram diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel fosfato de amônio e às soluções obtidas foram adicionadas as quatro espécies de As, para obter concentrações de mais 1,0 e mais 5,0 µg L⁻¹ de As. A seguir, executou-se a liofilização das referidas amostras. O mesmo procedimento foi seguido para as amostras de leite de arroz (comum e integral).

As alíquotas de 10 mL das amostras, fortificadas ou não, foram previamente congeladas. A seguir, essas alíquotas foram submetidas à liofilização durante 5 ciclos de 15 horas, até que não fosse mais observada a presença do solvente. Após as 75 horas de liofilização, as amostras foram reconstituídas até 10 mL com fase móvel e submetidas à análise de especiação de As por LC-ICP-MS, seguindo-se a mesma metodologia das demais determinações.

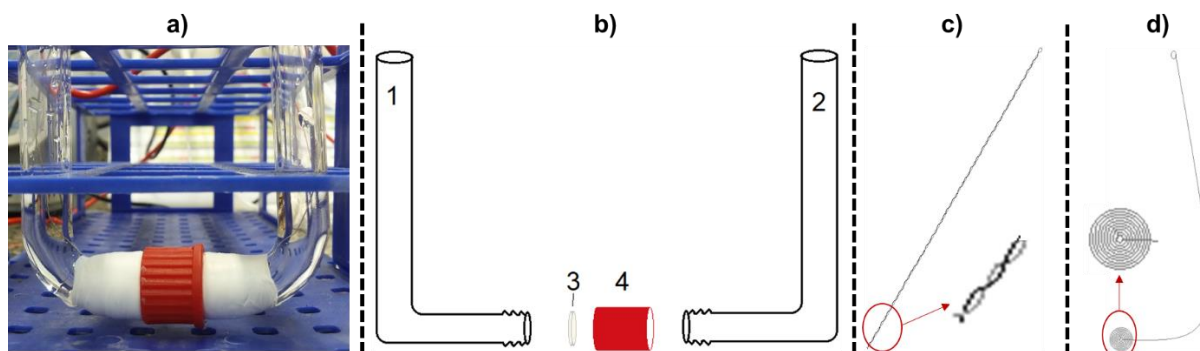
4.4.2.4 Eletroextração através de membrana

Visando a redução de interferências físicas e químicas por parte das matrizes das amostras e prevenir a interconversão das espécies durante o preparo das mesmas, a eletroextração foi investigada. Assim, foi feita uma avaliação da extração a líquido em meio trifásico com membrana.

Tendo em vista algumas dificuldades para o desenvolvimento do sistema, no período em que foi avaliado, o procedimento de eletroextração foi otimizado, fixando-se o tempo de extração em 10 min e variando-se a diferença de potencial (ddp) da fonte. Adicionalmente, foram avaliados o tipo de solvente adicionado sobre a membrana sólida (1-octanol e etanol) e o pH das fases aquosas doadora e aceptora (em 6,00 e 9,00). Tais avaliações foram feitas, primeiramente, empregando-se soluções de referência contendo as quatro espécies de As já mencionadas em concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, sem adição de etanol e com adição de etanol à solução de referência. Após estabelecimento das condições mais adequadas, iniciaram-se as avaliações para as amostras.

Para a proposta do emprego do método de EME, composto de uma SLM, foi desenvolvido um dispositivo em vidro, o qual consiste em um tubo em “U” (Figura 5), com diâmetro de 1,3 cm, sendo seccionado em duas partes que foram separadas por uma membrana de polipropileno (adaptada de um sistema de SPE) com 1,3 cm de diâmetro, 0,2 cm de espessura e 20 μm de porosidade. Nesse dispositivo, o volume máximo em cada secção do tubo é de 5 mL.

Figura 5 - Aparato desenvolvido e utilizado para o emprego de EME em (a) fotografia do tubo de EME montado; em (b) esquema do tubo de EME, onde 1 e 2 representam as secções das fases doadora e acceptora, 3) representa a SLM e 4) a conexão onde a SLM é posicionada entre as duas secções; em (c) configuração utilizada para os eletrodos de tungstênio e em (d) configuração utilizada para os eletrodos de platina.



Fonte: Autor.

As soluções doadora, contendo amostras ou solução de referência, e acceptora, contendo a fase móvel, foram transferidas para as secções 1 e 2 do tubo de EME (Figura 5b), respectivamente, com auxílio de uma pipeta previamente descontaminada. Após, o eletrodo que será carregado negativamente (cátodo) é inserido na secção 1, correspondente à fase doadora, enquanto o positivo (ânodo) é inserido na secção 2, contendo a fase acceptora. Desse modo, após a aplicação da diferença de potencial, na solução acceptora (secção 2) é inserida a seringa para aspiração da solução e posterior injeção direta na mesma no cromatógrafo para a análise de especiação de As por LC-ICP-MS pelo método otimizado neste trabalho. Para este estudo foram avaliados eletrodos de tungstênio “torcido” (Figura 5c) e, após, foram substituídos por eletrodos de platina em espiral (Figura 5d) tal como Orlando *et al.* (2014). Neste novo formato, buscou-se aumentar a superfície de contato dos eletrodos e estimular a formação de um campo elétrico uniforme entre os mesmos.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE LC-ICP-MS PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As

A seguir serão descritos os procedimentos metodológicos adotados para a otimização das condições de operação do sistema LC-ICP-MS com troca de íons empregado para a análise de especiação de As nas amostras de derivados do arroz.

Para tanto, avaliou-se o tipo, a concentração, a vazão e o pH de fase móvel. Além disso, também foi avaliado o efeito do metanol sobre a fase móvel para a análise de especiação de As.

Em cada avaliação, adotou-se como parâmetro para a escolha da condição mais adequada, o resultado conjunto que possibilitasse resolução mais adequada entre os picos cromatográficos, com menor tempo de retenção possível e a melhor sensibilidade.

4.5.1 Escolha da fase móvel

Foram escolhidos dois tipos de fase móvel para o desenvolvimento deste trabalho, tendo-se em vista a disponibilidade de uma coluna de troca aniônica, o que requer que a fase móvel contribua para que as espécies encontrem-se em forma de ânions e que sejam separadas. Por esse motivo, optou-se por soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, que são as mais indicadas para análise de especiação de As por troca aniônica (CORNELIS *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2018).

Para a escolha da melhor fase móvel, todas as investigações foram feitas para ambas as soluções, tomando-se por concentração inicial $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 9,0 mmol L⁻¹ e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 30,0 mmol L⁻¹. As referidas concentrações foram adotadas com base em avaliações preliminares envolvendo uma solução de referência contendo as espécies As(III), As(V), MMA e DMA, correspondendo a 5,0 µg L⁻¹ de As para cada espécie. Nessa avaliação preliminar observou-se uma resolução relativamente boa entre as referidas espécies, o que serviu como base para as próximas avaliações com cada tipo de fase móvel.

4.5.2 Avaliação da concentração de fase móvel

Para a avaliação da concentração da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fase móvel, a vazão desta foi fixada em 1,00 mL min⁻¹ e o pH em 6,00, de acordo com Sanz *et al.* (2005) e Huang *et al.* (2012). A partir disso, foram avaliadas as concentrações 7,0, 9,0 e 11,0 mmol L⁻¹. Todas as avaliações, para as três diferentes concentrações, foram para as amostras de vinagre de arroz e leite de arroz diluídas 1:4 (v v⁻¹) em água e para uma solução de referência contendo as quatro espécies de As (As(III), As(V), MMA e DMA), cada uma com 5,0 µg L⁻¹ de As.

Posteriormente, procedeu-se a avaliação da concentração da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como fase móvel. Para isso, fixou-se a vazão em $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e o pH em 8,60. Sendo assim, foram avaliadas as concentrações de 30,0 e 9,0 mmol L^{-1} , buscando-se uma similaridade com a condição intermediária da outra fase móvel avaliada. Neste caso, porém, a avaliação só foi executada para uma solução de referência contendo as quatro espécies de As já referidas, cada uma a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.

4.5.3 Avaliação da vazão de fase móvel

Uma vez estabelecidas as melhores concentrações para cada fase móvel, separadamente, avaliou-se a vazão da fase móvel a ser utilizada em cada situação. Para tal escolha, quando do emprego da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fase móvel, foram avaliadas as vazões de $0,90 \text{ mL min}^{-1}$, $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,10 \text{ mL min}^{-1}$. Já, para a escolha da vazão mais adequada, quando do emprego da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como fase móvel foram avaliadas as vazões de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, $1,10 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,20 \text{ mL min}^{-1}$.

Nesta avaliação, cabe ressaltar que para a escolha da melhor condição em cada caso, foi monitorada a pressão média exercida pela fase móvel sobre a coluna, além da melhor resolução entre os sinais cromatográficos, da maior sensibilidade dos sinais e do menor tempo de retenção possível.

4.5.4 Avaliação do emprego de fase móvel como diluente

Esta condição foi avaliada como estratégia de preparo das amostras, quanto a diluir as amostras e soluções de calibração na fase móvel a ser utilizada ou apenas em água, sob as condições de análise pertinentes à separação cromatográfica.

4.5.5 Avaliação do efeito de metanol sobre a análise de especificação de As

Na sequência das avaliações, para ambas as fases móveis, foi feito um estudo para verificar se havia influência do metanol junto à fase móvel sobre os sinais

cromatográficos das quatro espécies de As estudadas. Para tal, testou-se a influência da adição de metanol 1,0% (v v⁻¹) junto à fase móvel, comparando-se com os sinais obtidos sem adição de metanol à fase móvel. Estes testes foram feitos para as amostras de vinagre e leite diluídas 1:4 (v v⁻¹) e para uma solução de referência contendo as quatro espécies de As com concentração correspondendo a 5,0 µg L⁻¹ de As.

4.5.6 Avaliação do pH da fase móvel

Foi avaliada a influência do pH da fase móvel sobre a separação cromatográfica das espécies de As. Para isso, investigou-se o efeito do pH entre 4,00 e 8,00 para as avaliações nas melhores condições consideradas para (NH₄)₂HPO₄ como fase móvel e de 6,50 a 10,50 para (NH₄)₂CO₃ como fase móvel. Em ambos os casos, foram avaliados os valores de pH com variação de uma unidade.

Para esta avaliação, foram analisadas as amostras cerveja de arroz, saquê, vinagre e leite de arroz comum diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel, além de uma solução de referência contendo as quatro espécies de As estudadas, com concentração equivalente a 5,0 µg L⁻¹ de As para cada espécie.

4.5.7 Avaliação do efeito do etanol junto às amostras

A partir da verificação de possíveis interferências na análise cromatográfica, segundo testes preliminares, referentes às amostras de cerveja e saquê, foi avaliada a influência do etanol presente nas amostras, durante a análise de especificação do As por LC-ICP-MS.

Para tanto, foi avaliada a influência de etanol 0,1%, 0,5% e 1,0% (v v⁻¹) em água, para uma solução de referência contendo as quatro espécies de As estudadas, em concentração equivalente a 1,0 µg L⁻¹ de As. Não foram avaliados percentuais superiores de etanol tendo em vista que foi possível observar interferência crescente no cromatograma, somada ao acúmulo de carbono na superfície do cone de amostragem do equipamento de ICP-MS. A influência do etanol foi avaliada sob as condições cromatográficas já otimizadas.

4.5.8 Avaliação do efeito de outras substâncias orgânicas presentes nas matrizes analisadas

De modo a complementar o estudo sobre possíveis interferências das substâncias presentes em matrizes de amostras com elevado teor orgânico, como o vinagre, e em extratos de matrizes sólidas que envolvam solventes orgânicos, por exemplo o metanol.

Para o vinagre de arroz, foi feita a avaliação do efeito do ácido acético, similar ao estudo feito para o etanol, ou seja, foram preparadas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6,00 (fase móvel), sem e com diluição das quatro espécies de As, $1,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de As foi a concentração utilizada para cada espécie na solução. Para as soluções de fase móvel, o ácido acético foi adicionado para obter concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% (v v^{-1}) do mesmo, enquanto que para avaliar a influência sobre as espécies presentes, uma solução de referência das quatro espécies foi preparada em ácido acético 1,0% (v v^{-1}) diluído na fase móvel otimizada. De modo análogo, foram conduzidos testes sobre a influência do metanol nos mesmos percentuais, tendo em vista que diferentes trabalhos sobre análise de especiação de As em arroz reportam o uso de misturas metanol/água para a extração das espécies (NARUKAWA *et al.*, 2008; PIZARRO *et al.*, 2003a).

4.6 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As POR IC-ICP-MS

4.6.1 Determinação das espécies de As

As determinações de As foram efetuadas através de calibração externa sem ajuste de matriz para as amostras preparadas por diluição, evaporação ou liofilização. No caso da EME, as soluções de calibração foram também submetidas à eletroextração, de modo similar às amostras.

Adicionalmente, para a comparação dos resultados, às soluções de calibração foi adicionado etanol (calibração externa com ajuste de matriz), de modo a ajustar a concentração do mesmo nas soluções diluídas das amostras alcoólicas analisadas.

Nas amostras de leites de arroz e vinagre, as determinações foram também feitas mediante calibração por adição de padrão, a fim de se certificar dos resultados

obtidos por calibração externa, tendo em vista a ausência de materiais de referência para as espécies de As em matrizes similares às analisadas no presente trabalho.

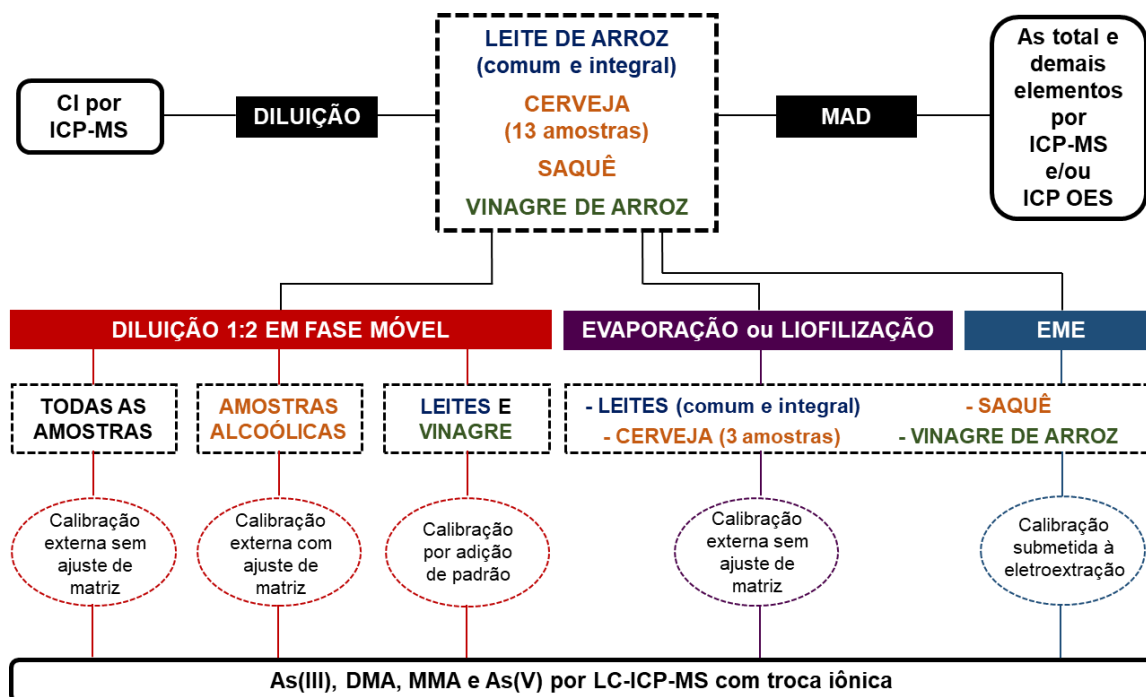
4.6.2 Avaliação da exatidão

Para a avaliação da exatidão dos métodos, tal como Moreira *et al.* (2011) adotou-se o guia *USA Food and Drug Administration (Validation of Analytical Procedures: Methodology)*, fez-se testes de recuperação dos analitos, adicionando-se os mesmos às soluções das amostras, de modo a obterem-se concentrações adicionais de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As. Além disso, em todos os casos, o somatório das espécies foi comparado com a concentração de As total determinada nas amostras por ICP-MS, após decomposição.

4.7 FLUXOGRAMA DE RESUMO DOS PROCEDIMENTOS

Na Figura 6 está apresentado um fluxograma que resume os procedimentos das propostas deste trabalho.

Figura 6 – Fluxograma de resumo dos procedimentos preparo das amostras para a determinação de As total, demais elementos e análise de especiação de As.



Fonte: Autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL

Para a comparação dos resultados na análise de especiação de As, foi determinada a concentração total de As em todas as amostras analisadas nesse estudo. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de As total obtido para todas as amostras.

Amostras	As total, $\mu\text{g L}^{-1}$
	ICP-MS
Leite de arroz comum	$29,5 \pm 1,2$
Leite de arroz integral	$46,9 \pm 2,0$
Cerveja I	$5,0 \pm 0,4$
Cerveja II	$4,0 \pm 0,8$
Cerveja III	$0,7 \pm 0,5$
Cerveja IV	$1,9 \pm 0,2$
Cerveja V	$2,2 \pm 0,1$
Cerveja VI	$2,5 \pm 0,8$
Cerveja VII	$2,7 \pm 0,1$
Cerveja VIII	$2,0 \pm 0,1$
Cerveja IX	$2,2 \pm 0,8$
Cerveja X	$1,7 \pm 0,1$
Cerveja XI	$1,8 \pm 0,4$
Cerveja XII	$1,7 \pm 0,1$
Cerveja XIII	$2,2 \pm 0,9$
Saquê	$13,0 \pm 1,1$
Vinagre	$5,3 \pm 0,4$
NIST® SRM® 1568b	$0,3 \pm 0,1^*$

* $\mu\text{g g}^{-1}$

Fonte: Autor.

Os resultados obtidos por ICP-MS foram comparados à soma das concentrações das espécies de As determinadas por LC-ICP-MS com troca iônica.

Nesse sentido, foi possível observar que os leites de arroz (comum e integral) e o saquê são as amostras com as concentrações mais elevadas de As total, nestes casos, superando $10 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o máximo tolerável por dia para As total, definido pela OMS para água potável (WHO, 2008). Em um segundo nível de concentração, destacam-se as outras três amostras conhecidamente derivadas de arroz, que são o vinagre de arroz e as cervejas I e II. Nos três casos, o resultado obtido equivale a, aproximadamente, metade do referido valor definido para a OMS em água potável.

Em um terceiro grupo, encontram-se as cervejas de III a XIII, as quais não apresentavam a informação da presença de arroz em sua composição, o que possivelmente refletiu em menores concentrações de As total, na faixa entre $0,7$ e $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.2 CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DAS AMOSTRAS

A fim de informações complementares, determinou-se diversos elementos químicos nas amostras analisadas. Na Tabela 6 estão mostradas as concentrações dos elementos determinadas nas amostras por ICP OES e ICP-MS. Além destes, também foram determinados Ag, Be, Bi, La, Li, Se e Ti, cujas concentrações estavam abaixo do LQ. Cabe destaque à concentração de Sb no vinagre de arroz, $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$, o que pode suscitar uma futura análise de especiação deste elemento no vinagre.

Tabela 6 - Resultados da análise elementar das amostras por ICP OES e ICP-MS. Os elementos Al, B, Ca, Fe, K, Mg, P e S foram determinados por ICP OES e os demais por ICP-MS.

(continua)

Elementos	Amostras, $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Leite de arroz	Cerveja de arroz	Saquê	Vinagre de arroz
Al	< 651	< 651	655	1448
B	127	257	129	301
Ba	11,0	14,1	101,3	60,5
Ca	51348	67832	44584	92838
Cd	0,260	< 0,035	0,128	1,16
Co	1,70	< 0,197	0,605	6,12
Cr	8,11	< 5,52	5,64	11,1
Cu	23,5	25,7	25,4	< 10,9

Tabela 6 – Resultados da análise elementar das amostras por ICP OES e ICP-MS. Os elementos Al, B, Ca, Fe, K, Mg, P e S foram determinados por ICP OES e os demais por ICP-MS. (conclusão)

Elementos	Amostras, $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Leite de arroz	Cerveja de arroz	Saquê	Vinagre de arroz
Fe	< 44,0	< 44,0	180	5800
K	81158	411822	48686	466295
Mg	14539	78196	7627	75837
Mn	377	86,0	1773	5441
Mo	46,3	2,14	3,25	9,18
Na	347433	39748	12548	49127
Ni	20,8	< 5,18	6,63	15,4
P	40837	176386	61694	78084
Pb	0,570	0,559	1,90	15,9
S	4034*	62225	24416	148001
Sn	< 0,315	0,828	1,09	< 0,315
Sr	26,4	328	162	314
V	3,26	16,9	3,68	18,2
Zn	350	< 70,4	713	2737

Fonte: Autor.

Para avaliar possível interferência isobárica pelo íon ArCl^+ ($m/z = 75$) sobre ^{75}As (B'HYMER e CARUSO, 2004), foi determinada por ICP-MS a concentração de cloro nas amostras diluídas. Nas cervejas a concentração média de cloro encontrada foi $357,9 \pm 2,0 \text{ mg L}^{-1}$, no vinagre de arroz foi $147,1 \pm 2,2 \text{ mg L}^{-1}$, no saquê foi $43,86 \pm 0,49 \text{ mg L}^{-1}$ e no leite de arroz foi $479,4 \pm 6,3 \text{ mg L}^{-1}$. Pelos valores encontrados, demonstra-se claramente a necessidade de diluir as amostras tanto quanto possível para reduzir ou eliminar a interferência do cloro sobre o As na análise de especiação do elemento por LC-ICP-MS (DUARTE *et al.*, 2007; POZEBON *et al.*, 1998).

5.3 OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES MAIS ADEQUADAS PARA ESPECIAÇÃO DE As POR LC-ICP-MS

Para encontrar as condições mais adequadas de separação e determinação das espécies por LC-ICP-MS com troca iônica, foram adotadas e/ou adaptadas

condições descritas por Moreira *et al.* (2011), quanto ao uso de carbonato de amônio como fase móvel e por Sanz *et al.* (2005), quanto ao uso de fosfato de amônio para o mesmo fim. Em ambos os estudos mencionados, também foram utilizadas colunas de troca aniônica tipo *Hamilton PRP-X100*, empregando-se LC-ICP-MS.

Desse modo, para as medições envolvendo solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fase móvel, adotou-se inicialmente de fosfato de amônio, $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6,00, vazão da fase móvel igual a $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, amostras diluídas em água e sem adição de metanol à fase móvel. Para as medições envolvendo $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como fase móvel, a concentração foi 30 mmol L^{-1} , pH igual a 8,58, vazão de fase móvel igual a $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, amostras diluídas em água e sem adição de metanol à fase móvel.

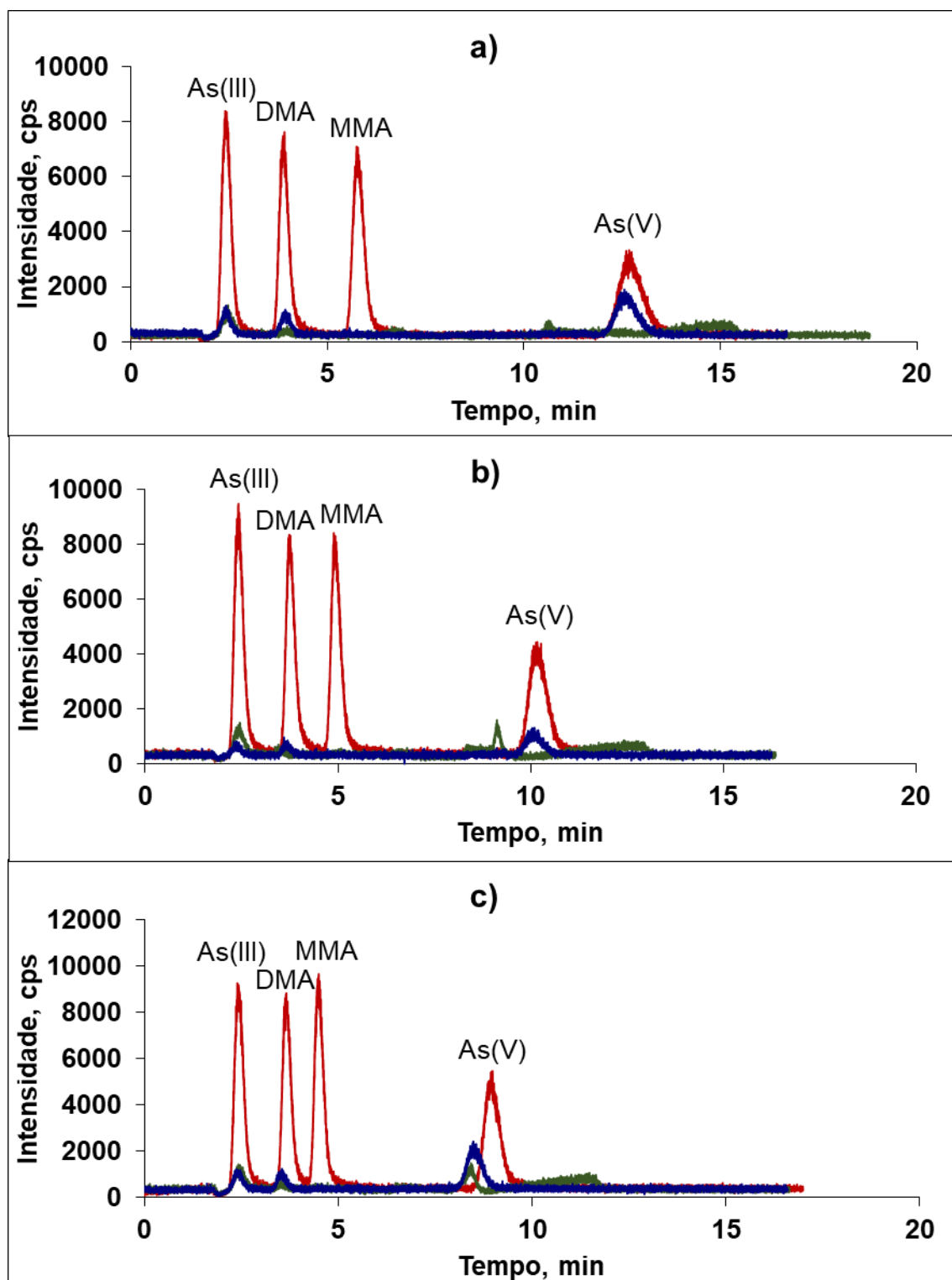
Sendo assim, como já mencionado, procedeu-se à otimização das condições para especiação de As(III), As(V), DMA e MMA, buscando-se condições em que se obtivesse a melhor resolução entre os sinais, melhor sensibilidade e o menor tempo de eluição possível. Cabe salientar que, o mesmo parâmetro sempre foi avaliado no mesmo dia de análise, no entanto, parâmetros diferentes foram avaliados em dias distintos, o que pode implicar em diferenças de intensidade dos sinais obtidos para uma mesma solução, devido às possíveis variações instrumentais.

Foram investigadas as condições mais adequadas, tanto para o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ quanto o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, como fase móvel. Convém destacar que para ambos a ordem de eluição das espécies foi As(III), DMA, MMA e As(V), na ordem escrita, exceto para condições em que ocorreram co-eluições, que serão explicadas mais adiante.

5.3.1 Avaliação da concentração de fase móvel

Como nos testes iniciais foram obtidos resultados satisfatórios para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foram então avaliadas concentrações diferindo em duas unidades menor e maior, respectivamente; $7,0$ e $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para essa avaliação foi analisada uma solução de referência contendo as quatro espécies de As em estudo, contendo o equivalente da $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As para cada espécie, uma solução de vinagre de arroz diluída 1:4 ($v v^{-1}$) em água e uma solução de leite de arroz, também diluída em água na mesma proporção, de acordo com Huang *et al.* (2012). Os cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Efeito da concentração de fosfato de amônio como fase móvel: (a) 7,0 mmol L⁻¹; (b) 9,0 mmol L⁻¹ e (c) 11,0 mmol L⁻¹, todas a uma vazão de 1,00 mL min⁻¹, em pH = 6,00. (—) Solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As; (---) leite de arroz e (---) vinagre de arroz diluídos 1:4 (v v⁻¹) em água.

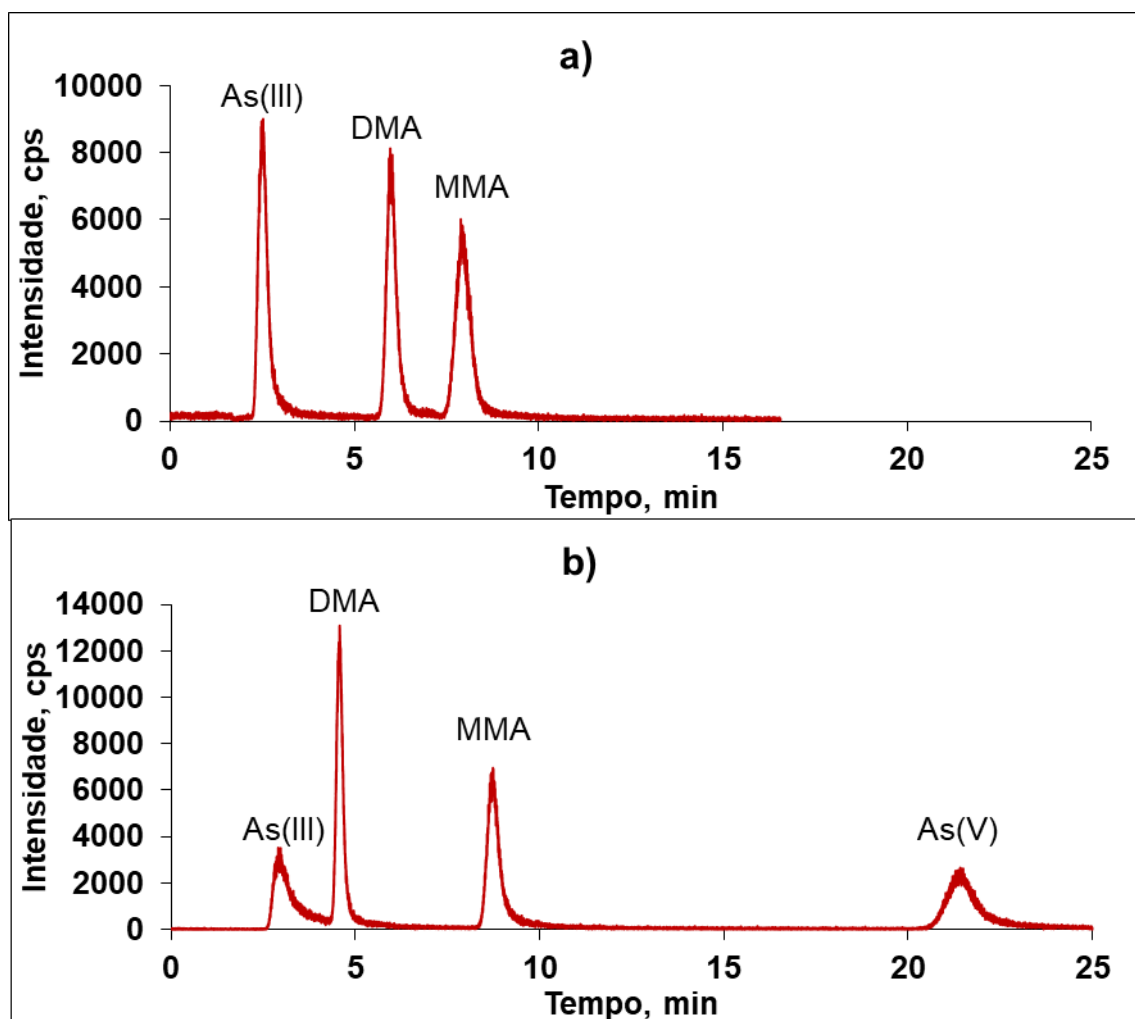


Fonte: Autor.

Com base na comparação visual dos cromatogramas mostrados na Figura 7, foi possível verificar que, embora se tenha obtido boa resolução entre as espécies para fosfato de amônio $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o tempo necessário para a eluição de todas as espécies foi mais de 12 minutos. Isso também implicou em uma pequena diminuição de área dos picos, o que pode diminuir a sensibilidade do método. Para fosfato de amônio $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$, observou-se um relativo incremento na relação altura do pico/linha base, no entanto, foi verificado que a separação das espécies DMA e MMA piorou, provavelmente pelo aumento da força iônica da fase móvel, o que pode interferir na correta quantificação dessas espécies. Sendo assim, a solução de fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi escolhida, visto que viabilizou boa separação entre as espécies, aliada a uma boa sensibilidade e um tempo menor para a separação das mesmas (menos de 12 minutos). Isso corrobora com condições similares relatadas por Sanz *et al.* (2005) e por Huang *et al.* (2012).

Depois de estabelecidas as melhores condições de separação das espécies, com solução de fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase móvel, avaliou-se a influência da concentração da solução de carbonato de amônio usada como fase móvel. No entanto, após testes prévios, avaliou-se apenas uma solução de referência contendo as quatro espécies de As em concentração equivalente a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As. Nesse contexto, foram avaliadas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, esta por similaridade com a concentração estabelecida para a solução de fosfato de amônio. Na Figura 8 é possível observar as diferenças para as duas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Figura 8 - Efeito da concentração de carbonato de amônio como fase móvel: (a) 9,0 mmol L⁻¹ e (b) 30,0 mmol L⁻¹, todas a uma vazão de 1,00 mL min⁻¹, em pH = 8,58. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As.



Fonte: Autor.

Com base nos cromatogramas mostrados na Figura 8, foi possível observar que carbonato de amônio 9,0 mmol L⁻¹ não foi adequado para a separação completa das quatro espécies de As em até 25 minutos. Nesse sentido, apesar da boa resolução entre as espécies, o tempo para determinação das mesmas seria demasiado longo. Assim, por prover em tese, a separação entre as quatro espécies em menos de 25 minutos, a solução de carbonato de amônio 30,0 mmol L⁻¹ foi escolhida para a sequência das avaliações, ainda que a separação entre As(III) e DMA não tivesse sido completa, tendo-se em mente que com mais otimizações este problema poderia ser resolvido. Concentrações maiores do que 30 mmol L⁻¹ não foram avaliadas a fim de minimizar a deposição de sal na interface do equipamento de ICP-MS (DOUGLAS e KERR, 1988).

5.3.2 Avaliação da vazão da fase móvel

Para a avaliação da vazão da fase móvel, solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, além de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, foram testadas $0,90 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,10 \text{ mL min}^{-1}$, a fim de se verificar algum incremento de resolução entre as espécies e menor tempo de eluição, respectivamente. Na Figura 9, são apresentados os cromatogramas obtidos para uma solução de referência contendo as quatro espécies de As estudadas e para soluções de vinagre de arroz e leite de arroz diluídas 1:4 (v v^{-1}) em água.

Figura 9 - Efeito da vazão de fase móvel: (a) $0,90 \text{ mL min}^{-1}$; (b) $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e (c) $1,10 \text{ mL min}^{-1}$, empregando-se fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{pH} = 6,00$. (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz diluídos 1:4 (v v^{-1}) em água.

(continua)

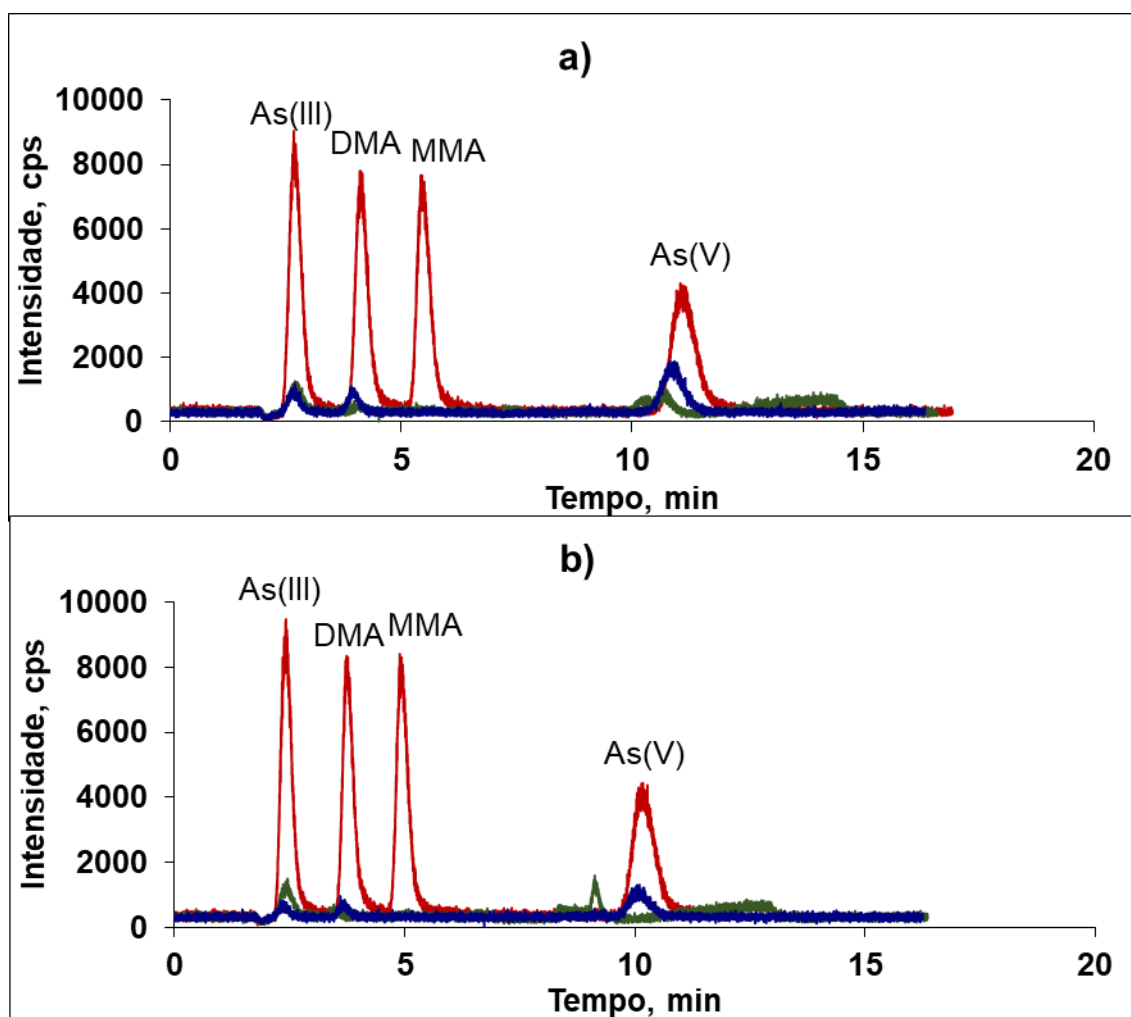
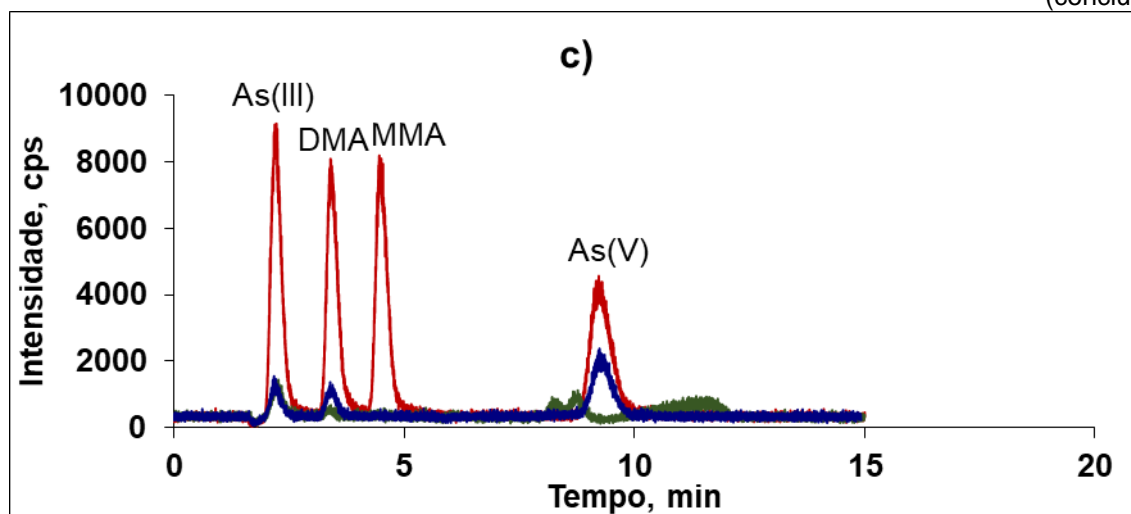


Figura 9 - Efeito da vazão de fase móvel: (a) 0,90 mL min⁻¹; (b) 1,00 mL min⁻¹ e (c) 1,10 mL min⁻¹, empregando-se fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, em pH = 6,00. (---) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As; (---) leite de arroz e (---) vinagre de arroz diluídos 1:4 (v v⁻¹) em água.

(conclusão)

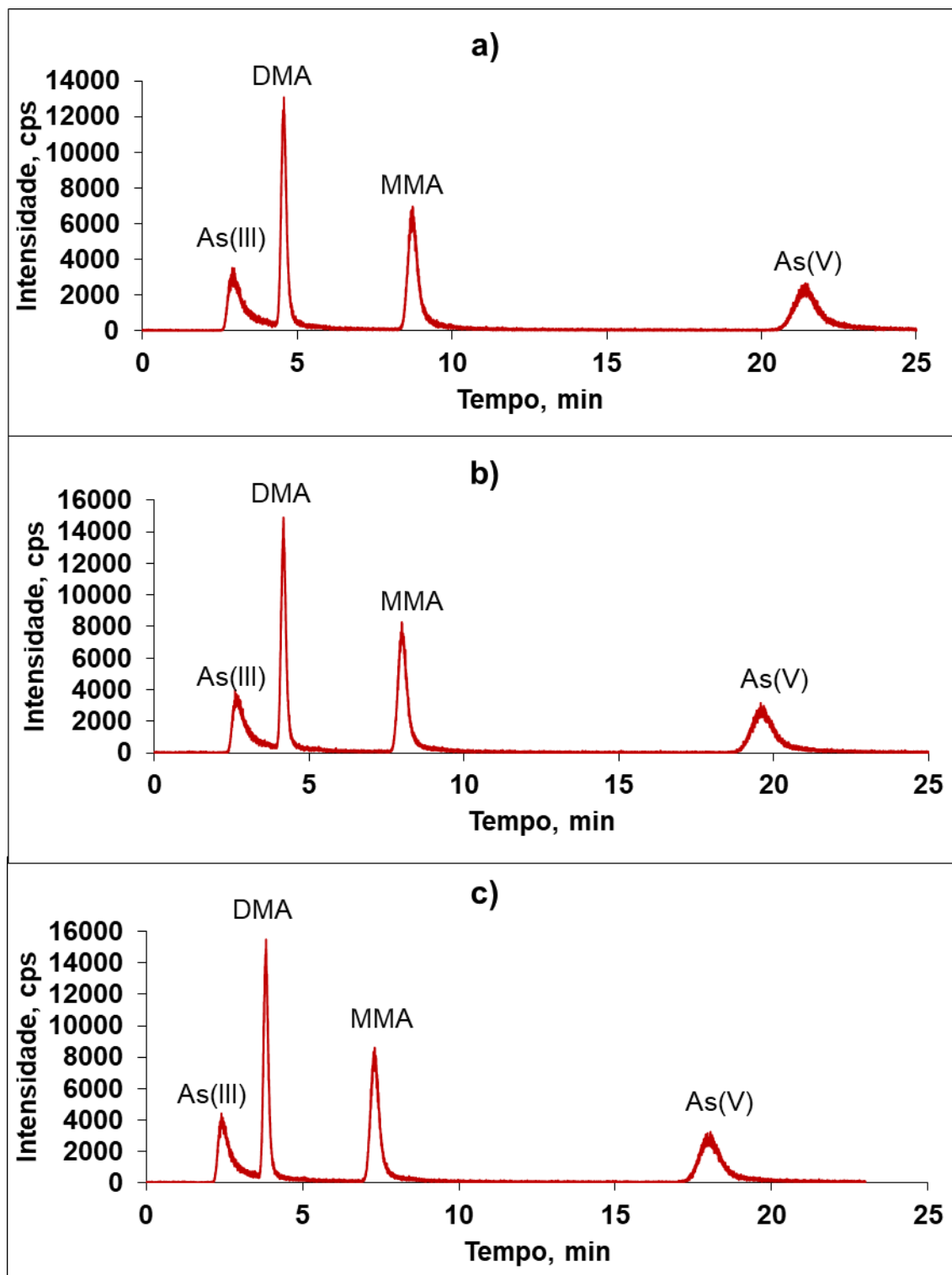


Fonte: Autor.

Com a avaliação das vazões de fase móvel, além da resolução, sensibilidade e tempo de eluição, também foi monitorada a pressão sobre a coluna durante as eluições. Apesar do menor tempo de eluição obtido para a vazão de 1,10 mL min⁻¹, foi possível verificar que os picos correspondentes aos sinais do DMA e MMA foram alargados. Além disso, nessa condição, verificou-se uma pressão acima de 3000 psi na coluna cromatográfica, podendo causar vazamentos que prejudicam as eluições cromatográficas no sistema utilizado. A partir disso, comparando-se as vazões 0,90 e 1,00 mL min⁻¹, observou-se que ambas propiciaram bons resultados, mas tempo menor de eluição foi o fator determinante para a escolha da vazão 1,00 mL min⁻¹.

No que tange à solução de carbonato de amônio 30,0 mmol L⁻¹ como fase móvel, também procederam-se testes para a escolha da vazão da mesma. Como neste caso o tempo de eluição das quatro espécies já era superior a 20 min, à vazão de 1,00 mL min⁻¹, foram avaliadas também vazões superiores a esta; 1,10 e 1,20 mL min⁻¹. Os cromatogramas obtidos nestas avaliações são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Efeito da vazão de fase móvel: (a) 1,00 mL min⁻¹, (b) 1,10 mL min⁻¹ e (c) 1,20 mL min⁻¹, em carbonato de amônio 30,0 mmol L⁻¹, pH = 8,58. (---) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As.



Fonte: Autor.

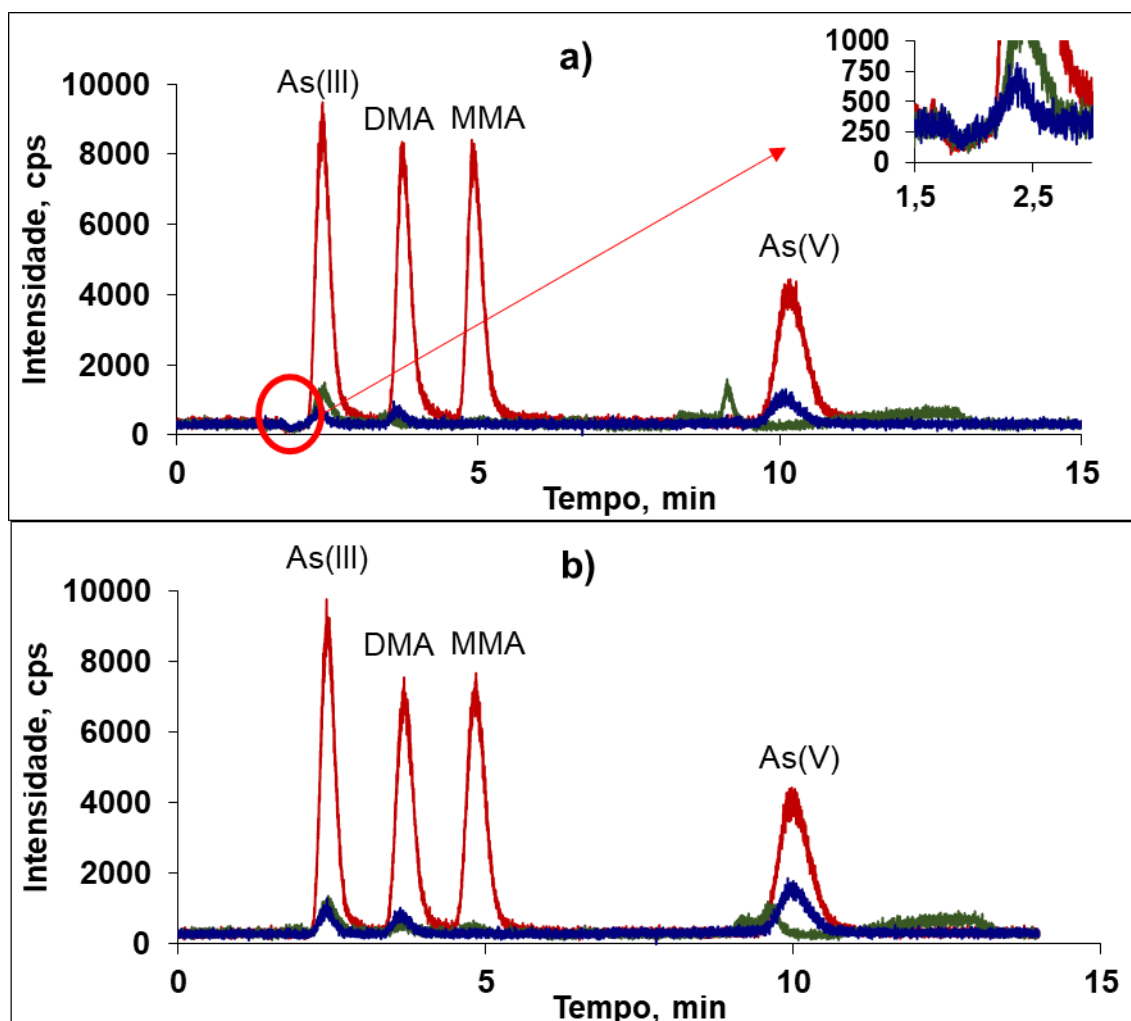
Com base no que pode ser observado na Figura 10, embora não haja diferenças notáveis visualmente na separação entre as espécies As(III) e DMA entre as três vazões testadas. Entretanto, houve diferença no tempo necessário para a eluição de todas as espécies, sendo assim, a vazão de $1,20 \text{ mL min}^{-1}$ viabilizou menor tempo de eluição (abaixo de 20 min).

5.3.3 Avaliação da diluição das amostras em água ou na fase móvel

O uso da fase móvel como diluente, ao invés da água, foi avaliado, tendo em vista alguma possível interferência ocasionada pela diferença das propriedades físico-químicas entre a fase móvel e a água. Este efeito pode ser a causa do vale (*drift*) observado no cromatograma em tempo imediatamente anterior à eluição de As(III), quando do emprego de solução de fosfato de amônio como fase móvel. Como uma das propostas deste estudo é a diluição das amostras para a posterior análise de especiação, esta avaliação deve ser destacada.

Na Figura 11 são apresentados os cromatogramas obtidos para uma solução de referência com as quatro espécies de As, em água ou na fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6,00, e vinagre de arroz e leite de arroz, diluídos 1:4 ($v v^{-1}$) tanto em água quanto na fase móvel mencionada.

Figura 11 - Efeito do tipo de diluente: (a) diluição em água e (b) diluição em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, pH = 6,00. (---) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As; (---) leite de arroz e (---) vinagre de arroz, diluídos 1:4 (v v⁻¹).

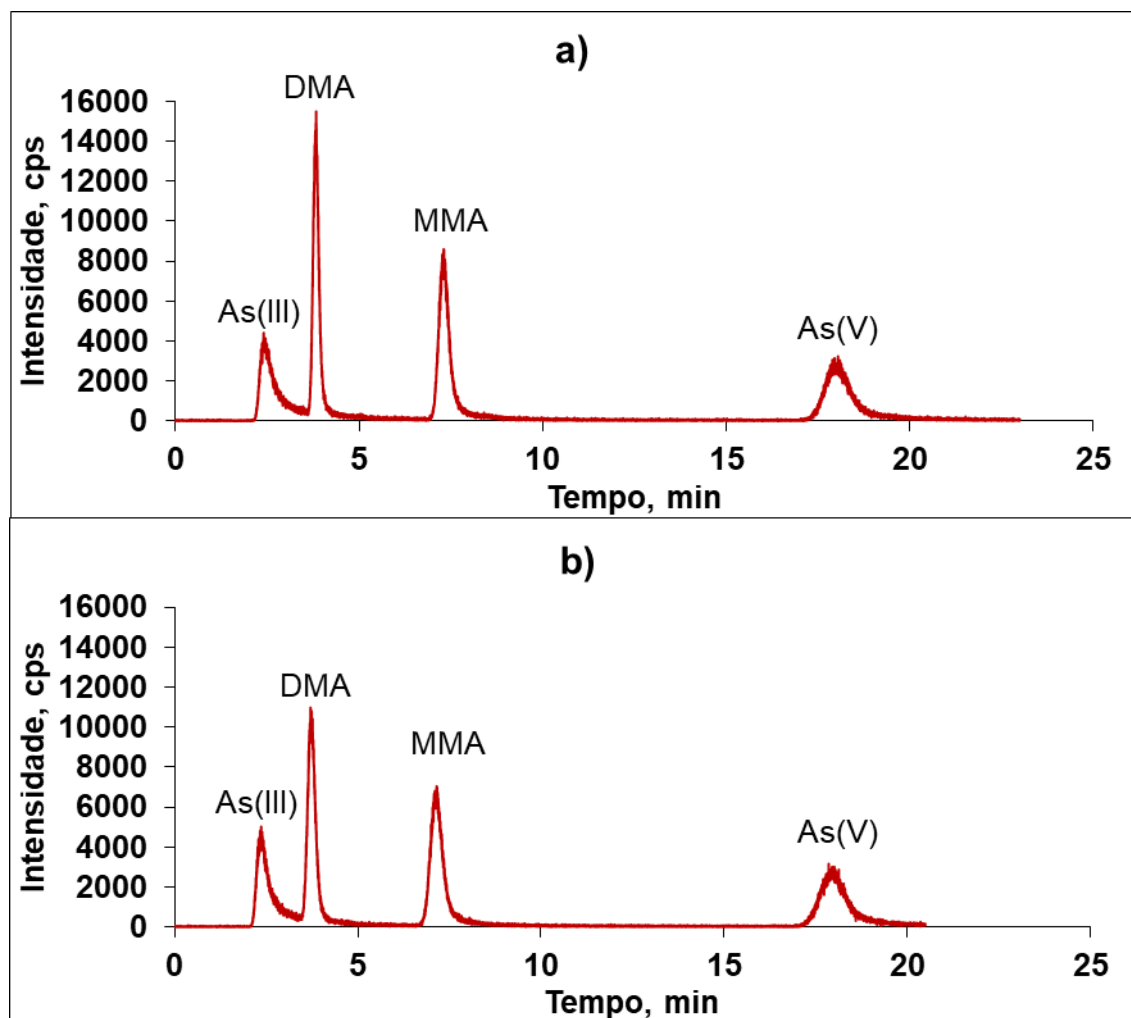


Fonte: Autor.

Analisando-se o cromatograma apresentado na Figura 11, foi possível observar a eliminação do *drift*, imediatamente anterior ao sinal de As(III), o que permite uma maior facilidade de integração da área do pico desta espécie. Além disso, foi corrigido um pequeno deslocamento de sinal do As(V) na amostra de vinagre quando este foi diluído na fase móvel. Por isso, a diluição da amostra na fase móvel foi escolhida para a sequência do presente trabalho.

Para o carbonato de amônio 30,0 mmol L⁻¹ em pH igual a 8,58, como fase móvel, a mesma avaliação foi feita (Figura 12). Nesta situação, porém, observou-se perda de sensibilidade quando uma solução de referência contendo as quatro espécies em estudo, com como mostrado na Figura 11. Por isso, adotou-se a diluição em água como condição de compromisso.

Figura 12 - Efeito do tipo de diluente: (a) diluição em água e (b) diluição em fase móvel carbonato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,58$. (---) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.

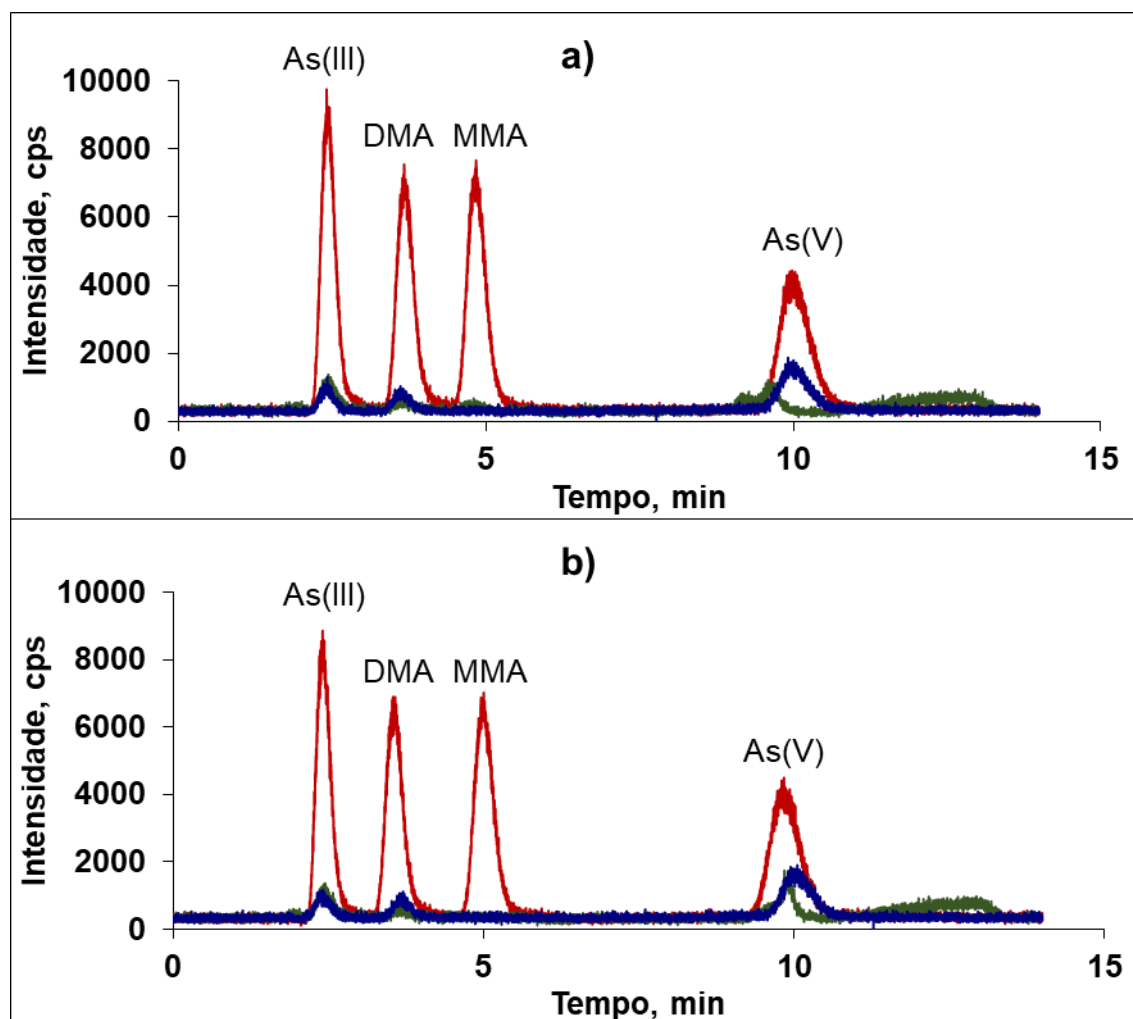


Fonte: Autor.

5.3.4 Avaliação do efeito do metanol junto à fase móvel

Para a verificação de possíveis ganhos de sensibilidade nos sinais das espécies de As por influência da presença de carbono junto à fase móvel, foi feito um teste, adicionando-se metanol, equivalente a $1,0\%$ ($v v^{-1}$) junto a cada fase móvel. Não foram avaliadas concentrações maiores em função da previsão de depósitos de carbono na interface do ICP-MS (LARSEN e STÜRUP, 1994). A influência de metanol adicionado a fase móvel fosfato de amônio é revelada na Figura 13, enquanto que a do carbonato de amônio é na Figura 14.

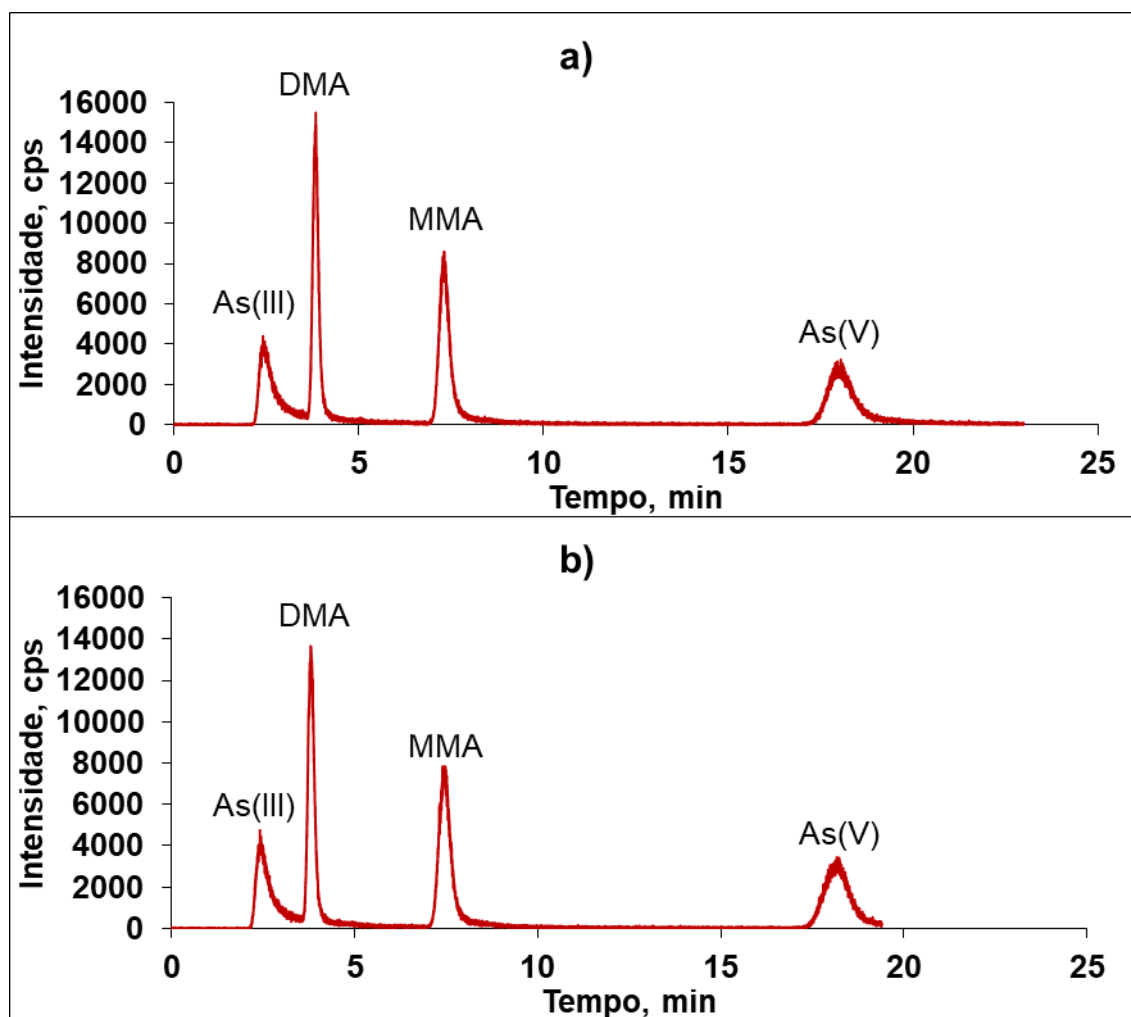
Figura 13 – Efeito da adição de metanol junto à fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, pH = 6,00: (a) sem metanol e (b) com metanol 1% (v v⁻¹). (--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de 5,0 µg L⁻¹ de As; (--) leite de arroz e (--) vinagre de arroz, diluídos 1:4 (v v⁻¹) na fase móvel.



Fonte: Autor.

Como pode ser observado nas Figuras 13 e 14, tanto para o emprego de solução de fosfato de amônio como fase móvel, quanto para o emprego do carbonato de amônio nesta função, percebeu-se alteração da linha base, o que indica que o metanol pode causar perda de sensibilidade para todas as espécies durante a análise de especiação. Por isso, a adição de metanol à fase móvel foi descartada.

Figura 14 - Efeito da adição de metanol junto à fase móvel carbonato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,58$: (a) sem metanol e (b) com metanol $1\% \text{ (v v}^{-1}\text{)}$. (---) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As diluída em água.



Fonte: Autor.

5.3.5 Avaliação do efeito do pH da fase móvel

Para a finalização das avaliações com respeito à fase móvel, o pH das soluções usadas como fase móvel foi ajustado em duas unidades acima e duas abaixo do valor do pH ajustado até então. O ajuste do pH foi feito pela adição controlada de soluções de HNO_3 $5\% \text{ (v v}^{-1}\text{)}$ ou NH_4OH $5\% \text{ (v v}^{-1}\text{)}$.

Portanto, para a solução de fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foram avaliados os valores de pH 4,00; 5,00; 6,00; 7,00 e 8,00, cujos resultados são apresentados na Figura 15, para uma solução de referência e amostras diluídas $1:2 \text{ (v v}^{-1}\text{)}$ na fase móvel.

Figura 15 - Efeito do pH da solução de fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, vazão de 1,00 mL min⁻¹.
(-- red) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 5,0 µg L⁻¹ de As;
(-- blue) vinagre de arroz; (-- green) leite de arroz; (-- orange) cerveja de arroz e (-- purple) saquê, diluídos 1:2
(v v⁻¹) na fase móvel.

(continua)

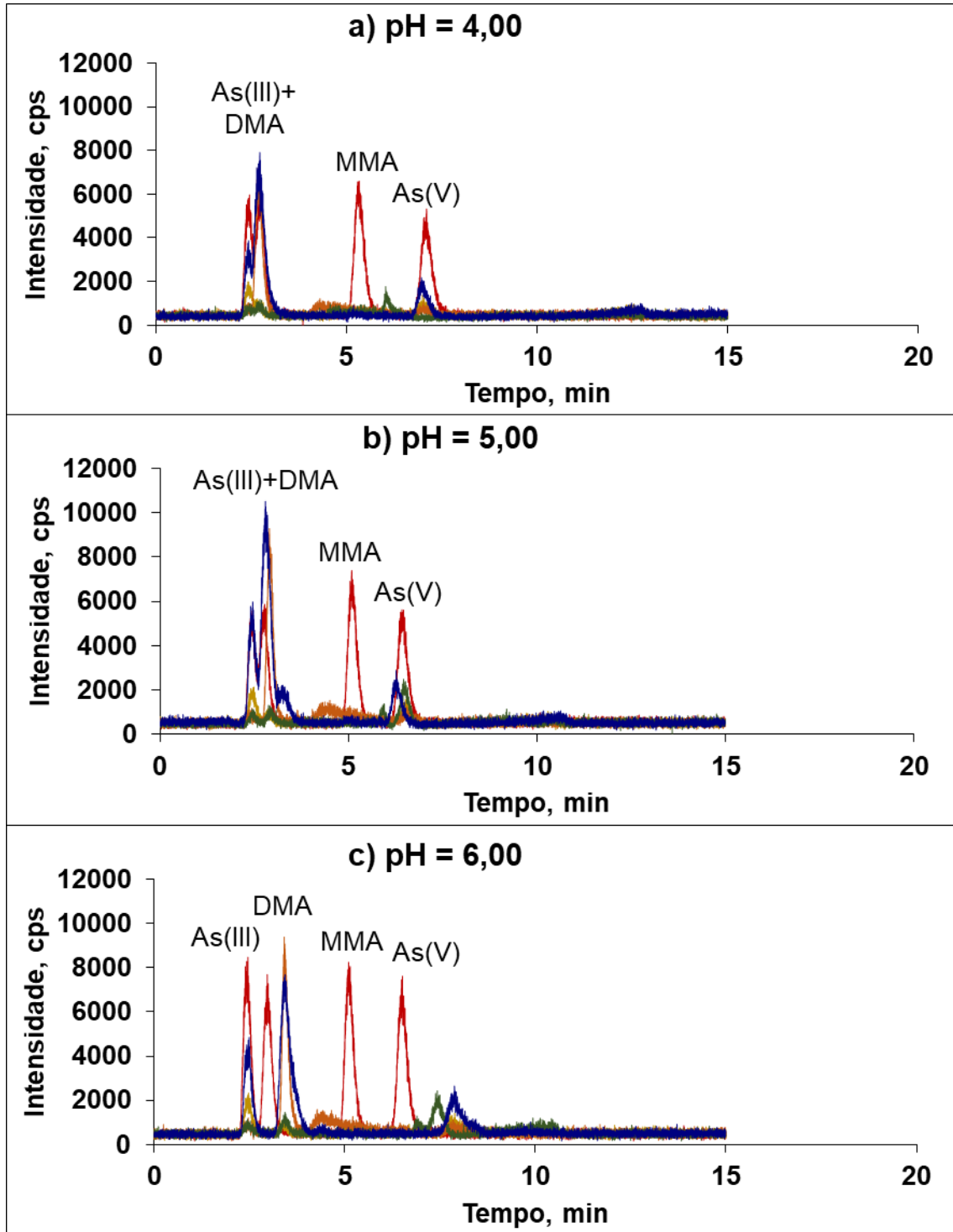
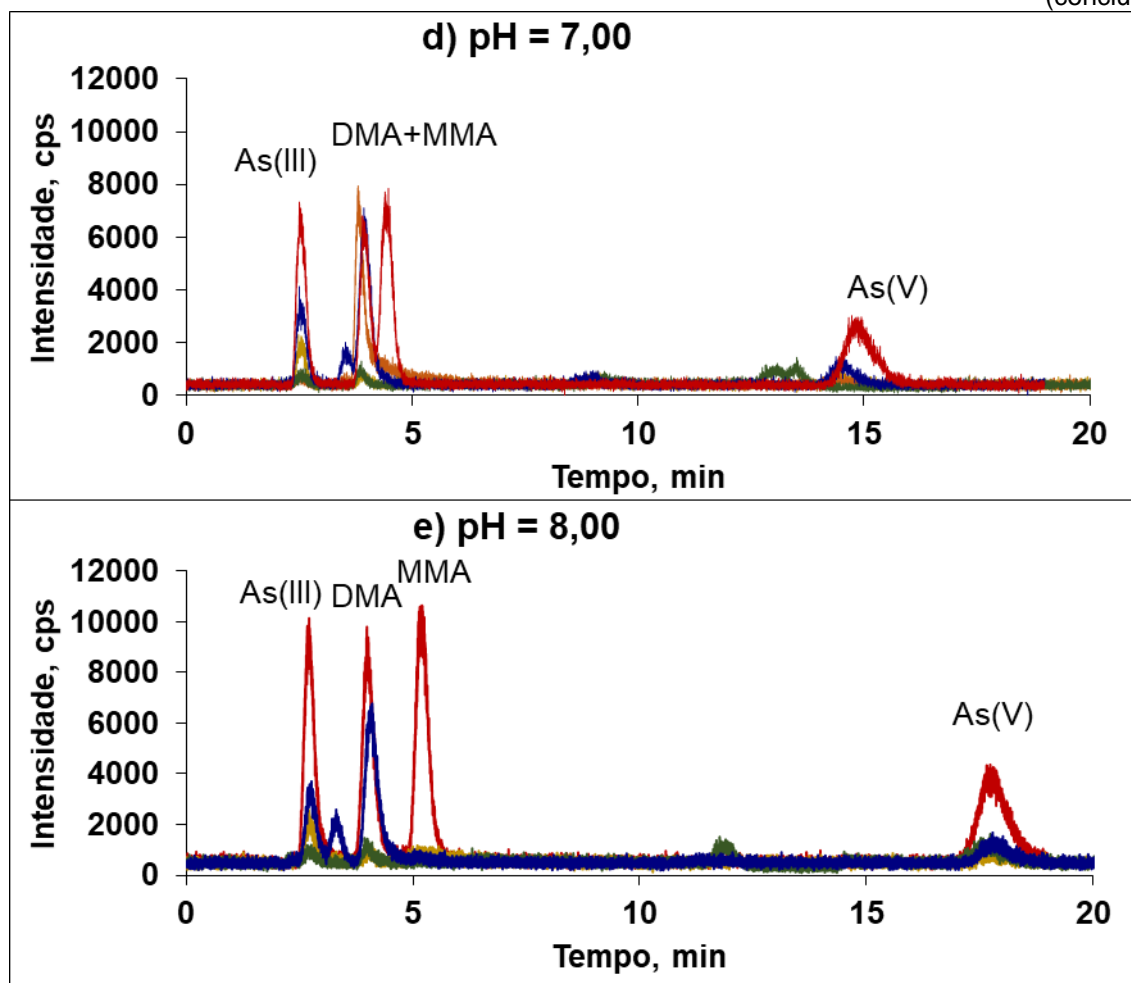


Figura 15 - Efeito do pH da solução de fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, vazão de 1,00 mL min⁻¹.
 (→) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 5,0 µg L⁻¹ de As;
 (→) vinagre de arroz; (→) leite de arroz; (→) cerveja de arroz e (→) saquê, diluídos 1:2
 (v v⁻¹) na fase móvel.

(conclusão)



Fonte: Autor.

Ao analisarmos os cromatogramas apresentados na Figura 15, podemos observar que em pH inferior a 6,00 não houve boa resolução entre as espécies As(III) e DMA, o que pode ser devido a menor intensidade de carga negativa sobre o DMA e As(III) em meio mais ácido, fazendo com que a interação com a coluna de troca aniônica utilizada fosse menor. Para pH 6,00 ou maior, pode-se observar resoluções satisfatórias para as espécies investigadas, tanto na solução de referência quanto nas amostras diluídas. O que também se justifica pela desprotonação da maioria das espécies, que são ácidos fracos. Por esse motivo, foi escolhida a condição de pH igual a 6,00 para a realização dos estudos subsequentes, uma vez que neste pH há boa resolução cromatográfica entre as espécies de As, com sensibilidade maior e tempo

de eluição menor, quando comparada aos resultados obtidos quando o pH da fase móvel era 7,00 ou maior.

Para a fase móvel carbonato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em vazão de $1,20 \text{ mL min}^{-1}$ foi avaliado o efeito do pH em 6,50; 7,50; 8,50; 9,50 e 10,50. Na Figura 16 são apresentados os cromatogramas para as mesmas quatro amostras diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) em água e solução de referência contendo o equivalente a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As para cada espécie, em água.

Figura 16 - Efeito do pH da solução de carbonato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão de $1,20 \text{ mL min}^{-1}$.
(--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As;
(--) vinagre de arroz; (--) leite de arroz; (--) cerveja de arroz e (--) saquê, diluídos 1:2 ($v v^{-1}$) em água.

(continua)

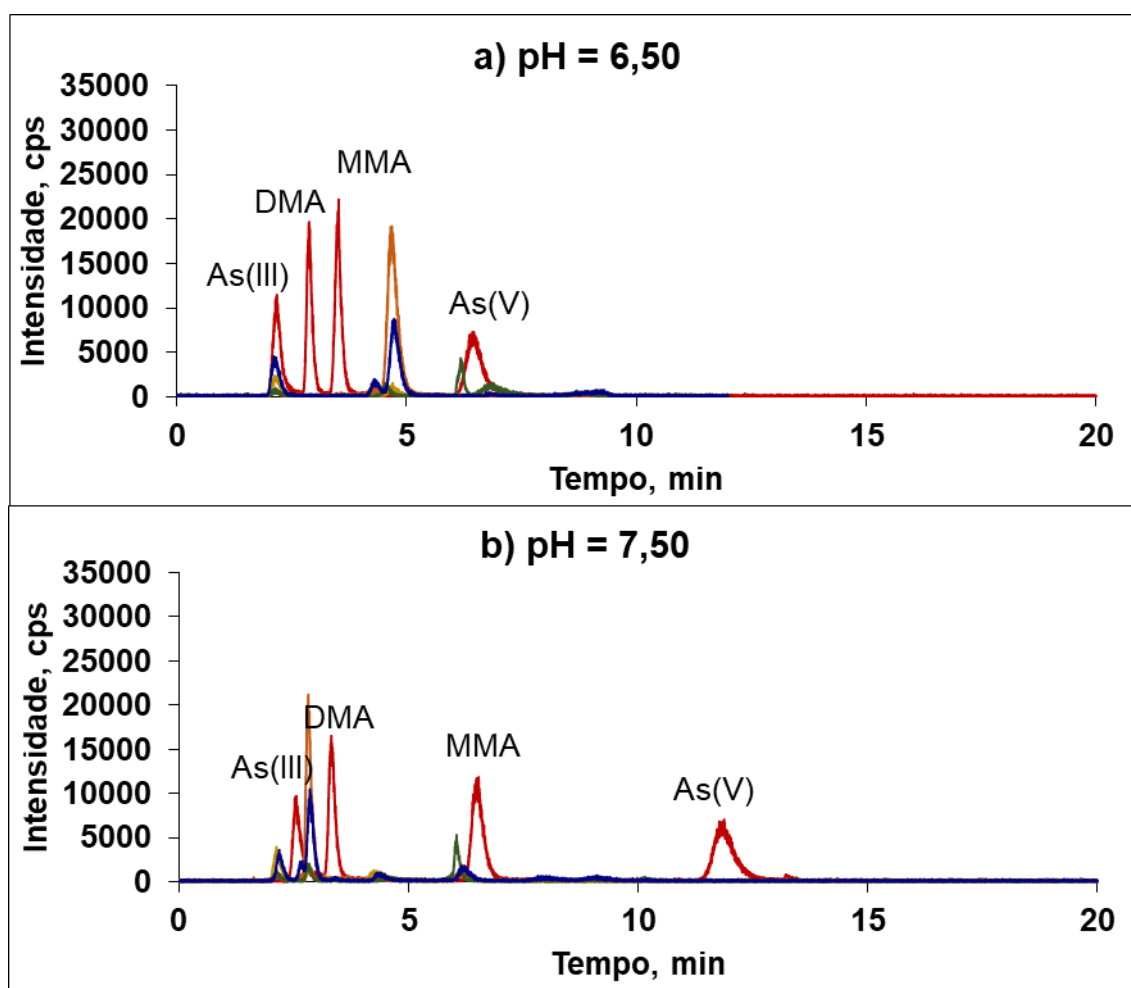
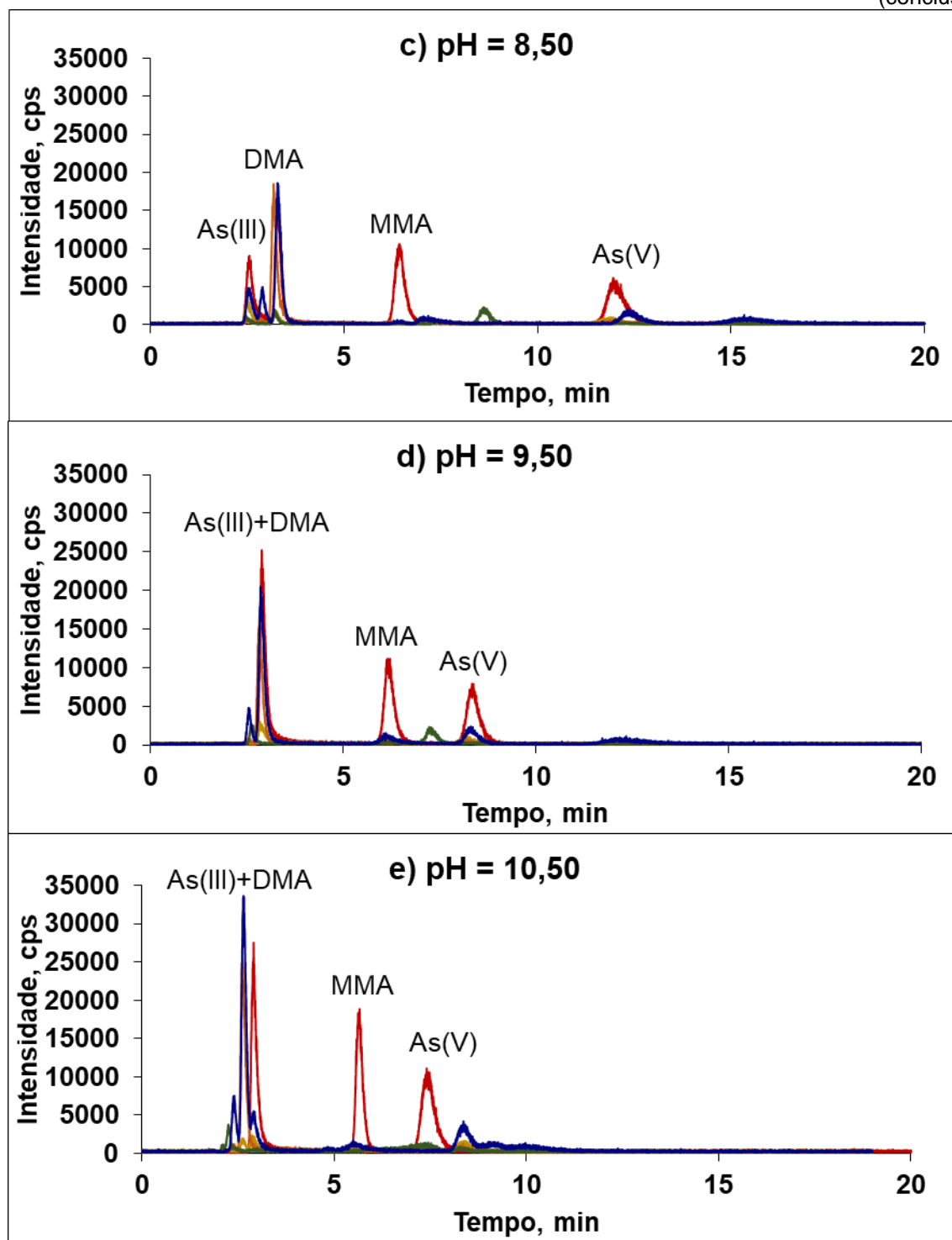


Figura 16 - Efeito do pH da solução de carbonato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão de $1,20 \text{ mL min}^{-1}$.
(--) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de As;
(--) vinagre de arroz; (---) leite de arroz; (---) cerveja de arroz e (---) saquê, diluídos 1:2
(v v^{-1}) em água.

(conclusão)

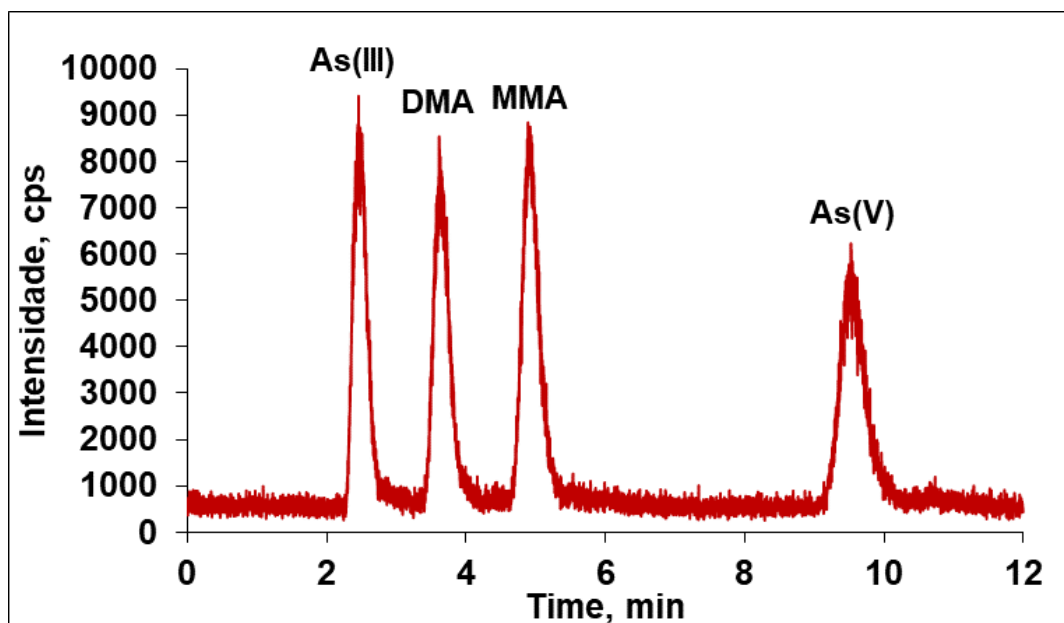


Fonte: Autor.

Diante dos cromatogramas mostrados na Figura 16, é possível observar que em pH igual ou superior a 9,50 não houve separação entre as espécies As(III) e DMA.

Ao contrário disso, em pH igual ou inferior a 8,50, houve melhor separação entre as espécies para a solução de referência. No entanto, entre o As(III) e o DMA não foi observada resolução suficiente, o que pode ser comprovado pela comparação das áreas dos respectivos picos. Além disso, em pH 6,50 observou-se que, com a diminuição do tempo de eluição, as interferências de matriz foram mais acentuadas, sobretudo para o vinagre de arroz. Sendo assim, sem a obtenção de uma condição adequada para esta fase móvel, a mesma foi descartada. Os estudos subsequentes foram conduzidos empregando-se como fase móvel apenas a solução de fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH = 6,00, à vazão de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, sendo às amostras e soluções de calibração diluídas nesta fase móvel. Na Figura 17 é apresentado o cromatograma de uma solução de referência contendo as quatro espécies de As em estudo.

Figura 17 - Cromatograma de uma solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As preparada em fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 6,00 e vazão de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$.



Fonte: Autor.

5.3.6 Avaliação do efeito do etanol presente nas amostras

Como já mencionado no item 2 deste trabalho, Huang *et al.* (2012) procederam a análise de especiação de As, determinando As(III), DMA, MMA e As(V) em diversas amostras com matrizes alcoólicas. Para estas amostras, os autores mencionam o pico

de uma espécie de As desconhecida em tempo de retenção entre a eluição das espécies DMA e As(V). Os autores também empregaram LC-ICP-MS, com coluna de troca aniônica e fase móvel em condições similares às utilizadas no presente trabalho. Moreira *et al.* (2011) desenvolveram método de análise para determinação de As(III), DMA, MMA e As(V) em vinho branco, diluídos em água, e encontraram concentrações relativamente elevadas de As(V), com tempo de retenção e perfil de pico similares ao observado para a espécie desconhecida observada por Huang *et al.* (2012). Cabe salientar que o trabalho de Moreira *et al.* (2011) envolveu também LC-ICP-MS, com coluna de troca aniônica, porém com fase móvel fosfato de amônio com concentração cerca de duas vezes maior, em comparação com a fase móvel utilizada na presente trabalho ou aquela utilizada por Huang *et al.* (2012).

Analisando-se os perfis cromatográficos das amostras do presente estudo (Figura 18), verificou-se a presença de picos de perfis e tempos de eluição similares aos observados por Huang *et al.* (2012) e Moreira *et al.* (2011). Porém, para as amostras não alcoólicas esse pico desconhecido não apareceu. É possível que a espécie desconhecida observada por Huang *et al.* (2012) e a interferência sobre As(V) citada por Moreira *et al.* (2011), sejam devidas ao etanol somente, em tempo de eluição específico, e não se trate de uma espécie de As, como suscitado por Huang *et al.* (2012).

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos para as amostras diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel: (a) cerveja de arroz; (b) saquê; (c) vinagre de arroz e (d) leite de arroz, todos em fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, pH = 6,00 e vazão de 1,00 mL min⁻¹.

(continua)

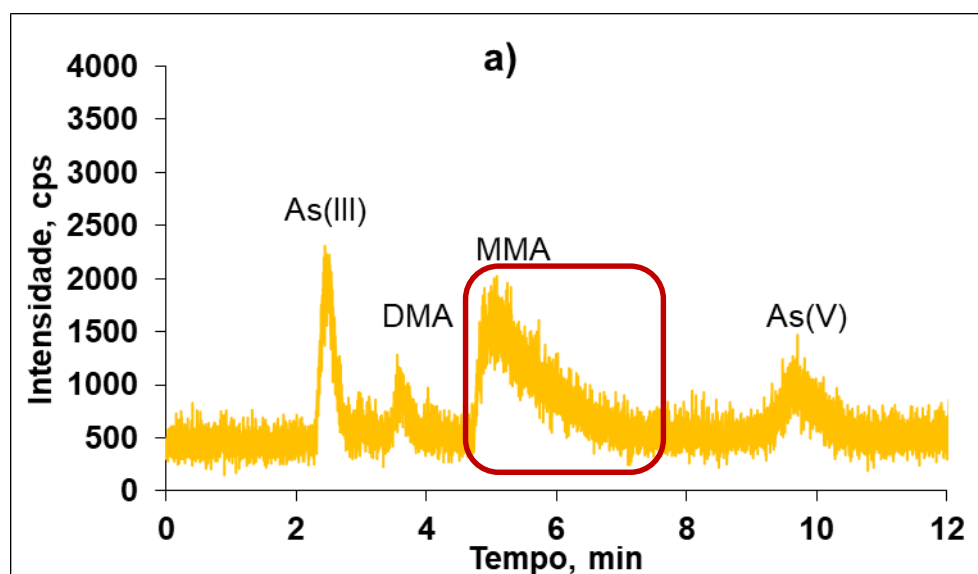
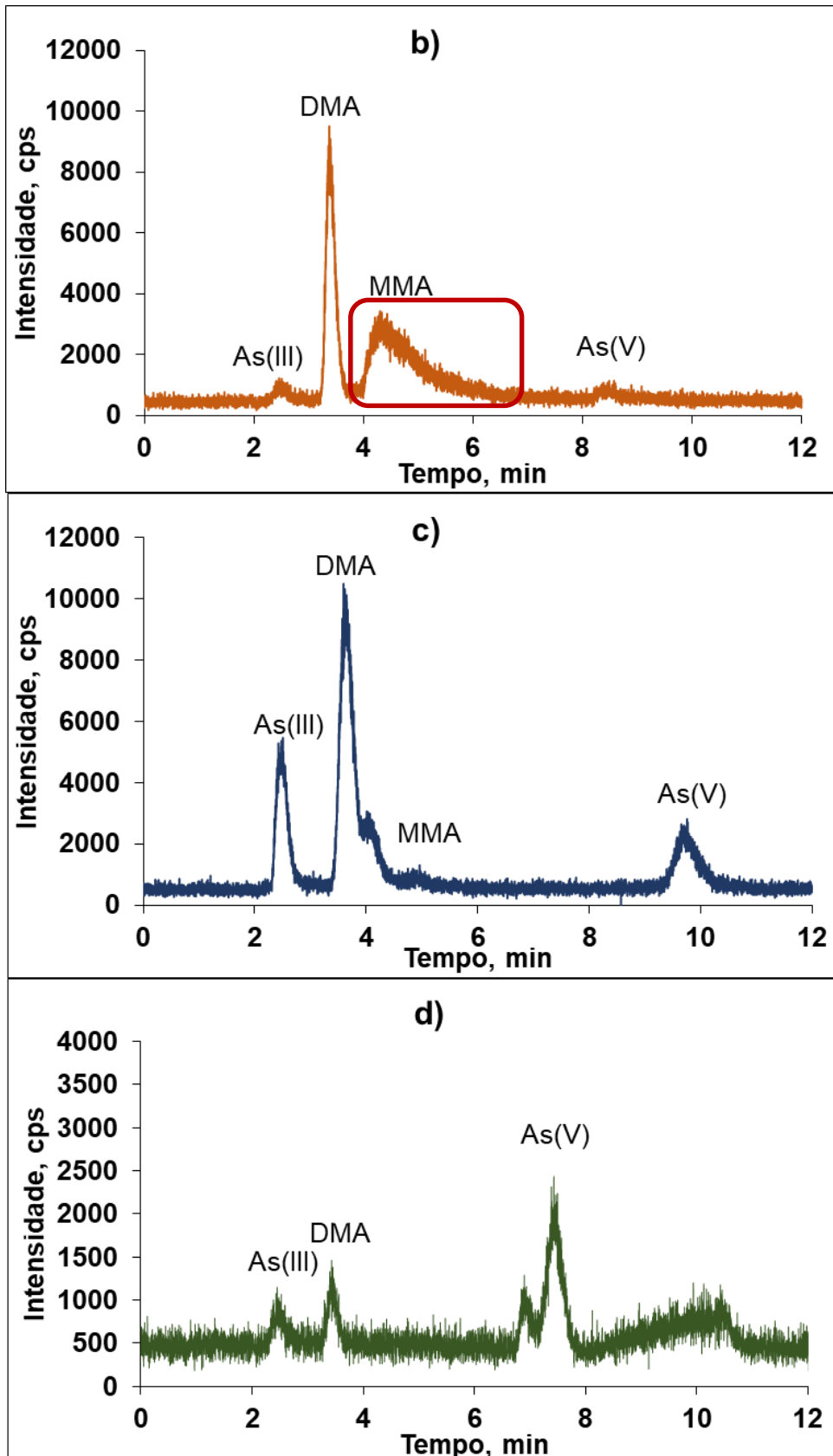


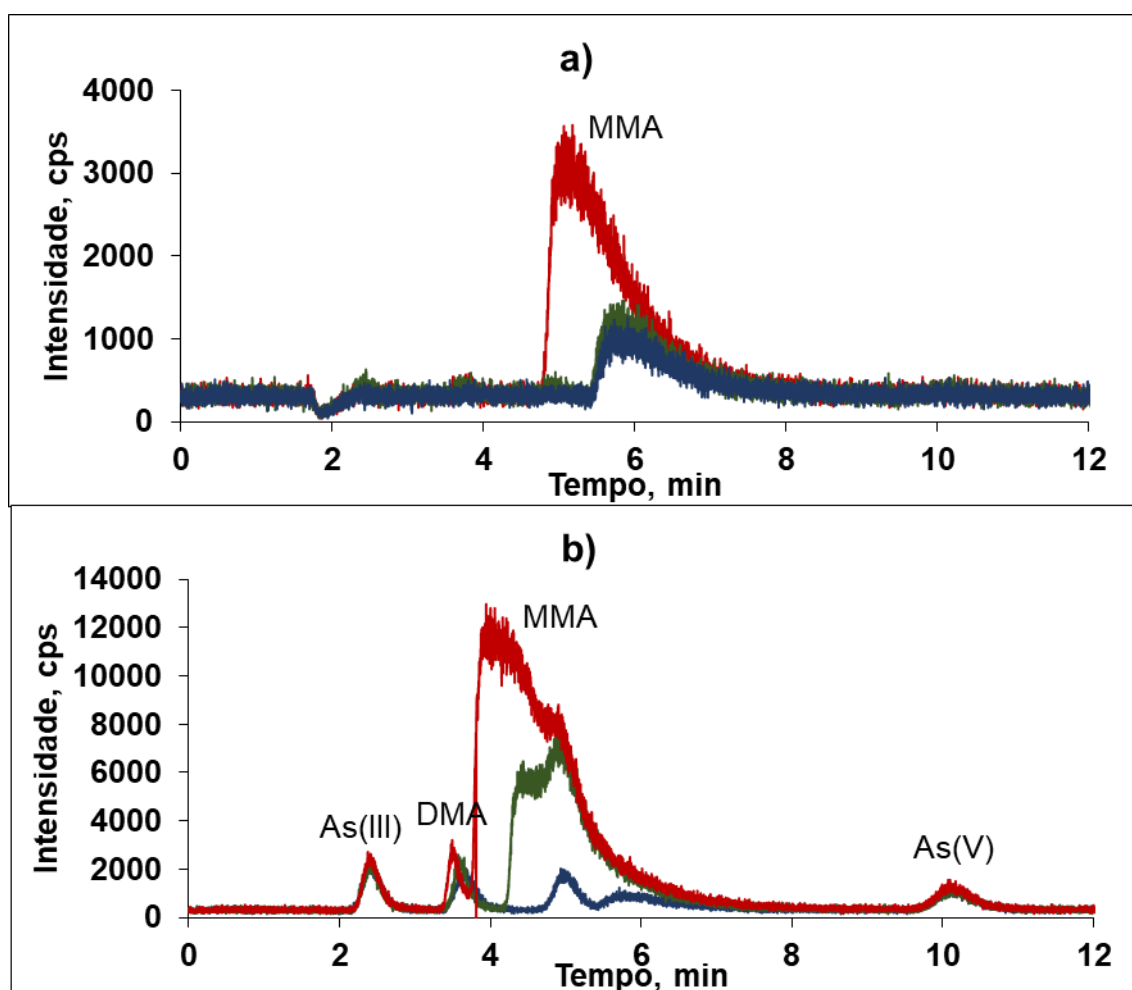
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos para as amostras diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) na fase móvel: (a) cerveja de arroz; (b) saquê; (c) vinagre de arroz e (d) leite de arroz, todos em fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 6,00 e vazão de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$.

(conclusão)



Para investigar a possível interferência do etanol, foram preparadas três soluções do mesmo contendo 0,1; 0,5 e 1,0% ($v v^{-1}$) diluídas com fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6,00. Da mesma forma, o etanol também foi adicionado a soluções de referência contendo as espécies de As investigadas, diluídas na fase móvel. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 19.

Figura 19 - Efeito do etanol adicionado nas proporções volumétricas: (--) 0,1%, (---) 0,5% e (---) 1,0% ($v v^{-1}$) em soluções contendo: (a) solução da fase móvel e (b) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.



Fonte: Autor.

Na Figura 19 é possível observar grande interferência de etanol, tanto sobre a solução preparada apenas em fase móvel (Figura 19a) quanto sobre o pico do MMA (Figura 19b). Observa-se que o pico, com ou sem MMA, se alarga na medida em que a concentração de etanol é aumentada, prejudicando a análise de especiação.

Na busca de explicações para o efeito do etanol, encontrou-se que a interferência do carbono ocorre sobre todas as espécies de As, como esperado para

o metanol junto à fase móvel (LARSEN e STÜRUP, 1994) ou do etanol sobre o As(III), em função de pK_a do álcool ser mais elevado (15,9) que o dessa espécie (NCBI, 2018). No presente caso, é possível que o etanol esteja atuando como se fosse uma espécie química, tal como as demais, em termos de retenção na coluna. O fato dele conferir sinal com área relativamente grande, mesmo na fase móvel junto ao etanol e sem adição dos analitos, tem relação com a presença de As como contaminante e ao ganho de sinal ocasionado pelo efeito de carbono (LARSEN e STÜRUP, 1994). A fase móvel fosfato de amônio contém arsênio como contaminação natural, neste caso $0,133 \mu\text{g L}^{-1}$ de As total, em função das similaridades deste elemento com o fósforo (ABEDIN *et al.*, 2002; HINGSTON *et al.*, 1971).

A coluna de troca aniônica *Hamilton PRP-X100* é composta por poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB) com grupos funcionais ativos de trimetilamônio (HAMILTON, 2018). Desse modo, tal como ocorre com as espécies de As que podem formar ligações de hidrogênio com estes grupamentos, que são altamente eletronegativos, também o etanol possui tal capacidade (MARTINS *et al.*, 2013) e, provavelmente, com característica similar ao MMA em fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e pH 6,00.

Sendo assim, é evidente a possível influência do etanol presente na matriz da amostra sobre uma espécie de As específica, sendo nesse estudo o MMA. Por esse motivo, torna-se necessário contornar esse problema a fim de que se obtenha uma análise de especiação de acordo com a verdadeira concentração das espécies de As presentes nas amostras.

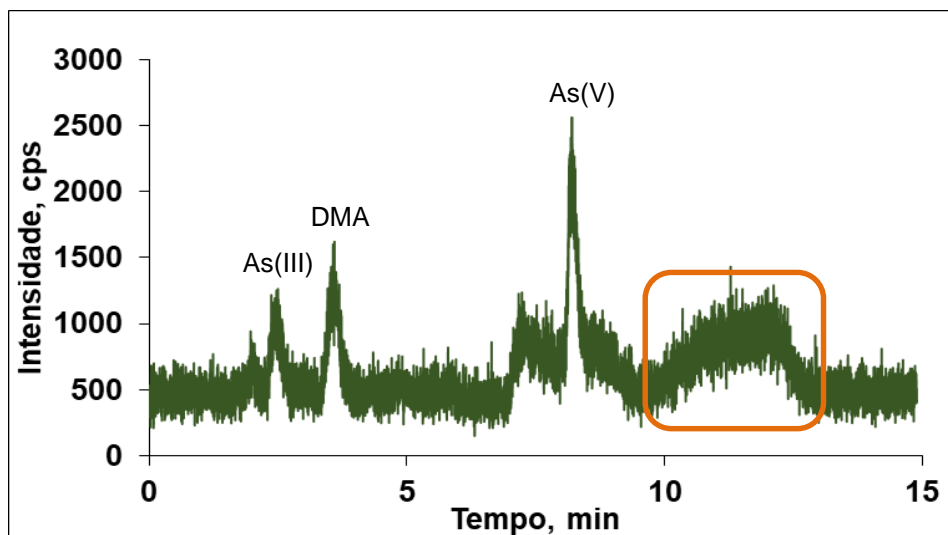
Adicionalmente, foi observado que o aumento da área do pico promovido pela interferência de etanol pode ser relacionado linearmente com a concentração de etanol presente. Isso torna possível inferir que tal fenômeno pode funcionar como uma forma de medida indireta da concentração de etanol.

5.3.7 Avaliação do efeito de outras substâncias orgânicas presentes nas matrizes das amostras analisadas

Ao analisarem uma amostra de vinagre de vinho, Huang *et al.* (2012) observaram a presença de uma espécie que denominaram como “desconhecida” após o tempo de retenção que seria atribuído ao pico de As(V). O mesmo pico também foi observado no presente trabalho para a amostra de vinagre de arroz diluída 1:2 (v v⁻¹)

na fase móvel (Figura 20). Vale mencionar que as condições experimentais do presente estudo são similares àsquelas do estudo conduzido por Huang *et al.* (2012).

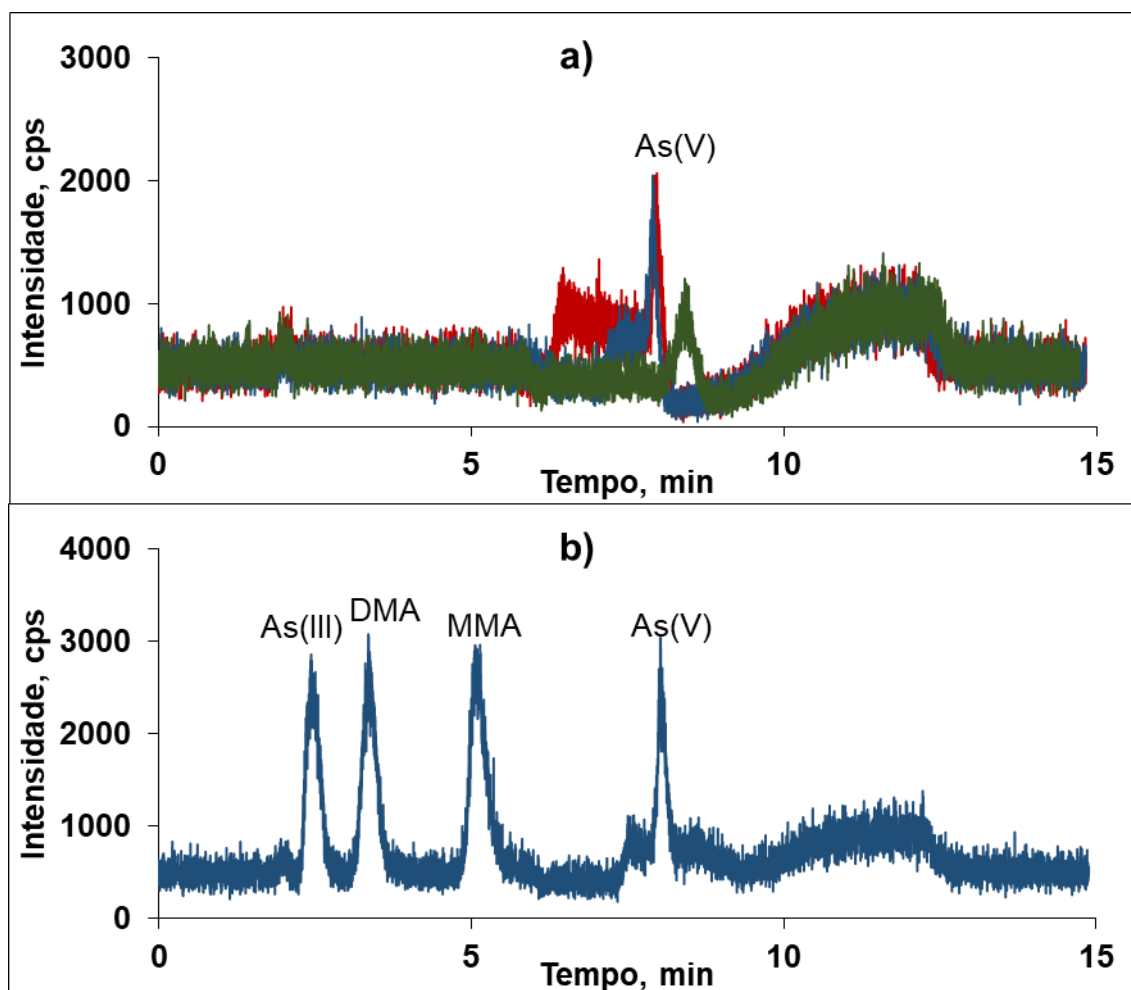
Figura 20 - Cromatograma da amostra de vinagre de arroz diluída 1:2 ($v v^{-1}$) em fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6,00.



Fonte: Autor.

Na Figura 20 percebe-se o aparecimento de um sinal que não se refere a qualquer uma das espécies de As investigadas no vinagre. Em função dos resultados obtidos para o etanol, buscou-se também investigar se efeito similar não poderia estar ocorrendo em função da presença do ácido acético, por consequência do acetato formado na presença da fase móvel em pH 6,00. Por isso, foram preparadas e analisadas soluções com fase móvel contendo 0,5; 1,0 e 2,0% ($v v^{-1}$) de ácido acético. Paralelamente foi preparada e analisada uma solução de referência contendo as espécies As(III), DMA, MMA e As(V) em concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, preparada com fase móvel e adição de ácido acético a 1,0% ($v v^{-1}$). Os cromatogramas obtidos para estas soluções são apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Cromatogramas obtidos para soluções preparadas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, com pH 6,00; em (a) apenas solução de fase móvel com adição de ácido acético a (--) 0,5%; (--) 1,0% e (--) 2,0% (v v⁻¹) e em (b) solução de referência (--) contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com 1,0 µg L⁻¹ de As e adição de ácido acético a 1,0% (v v⁻¹).



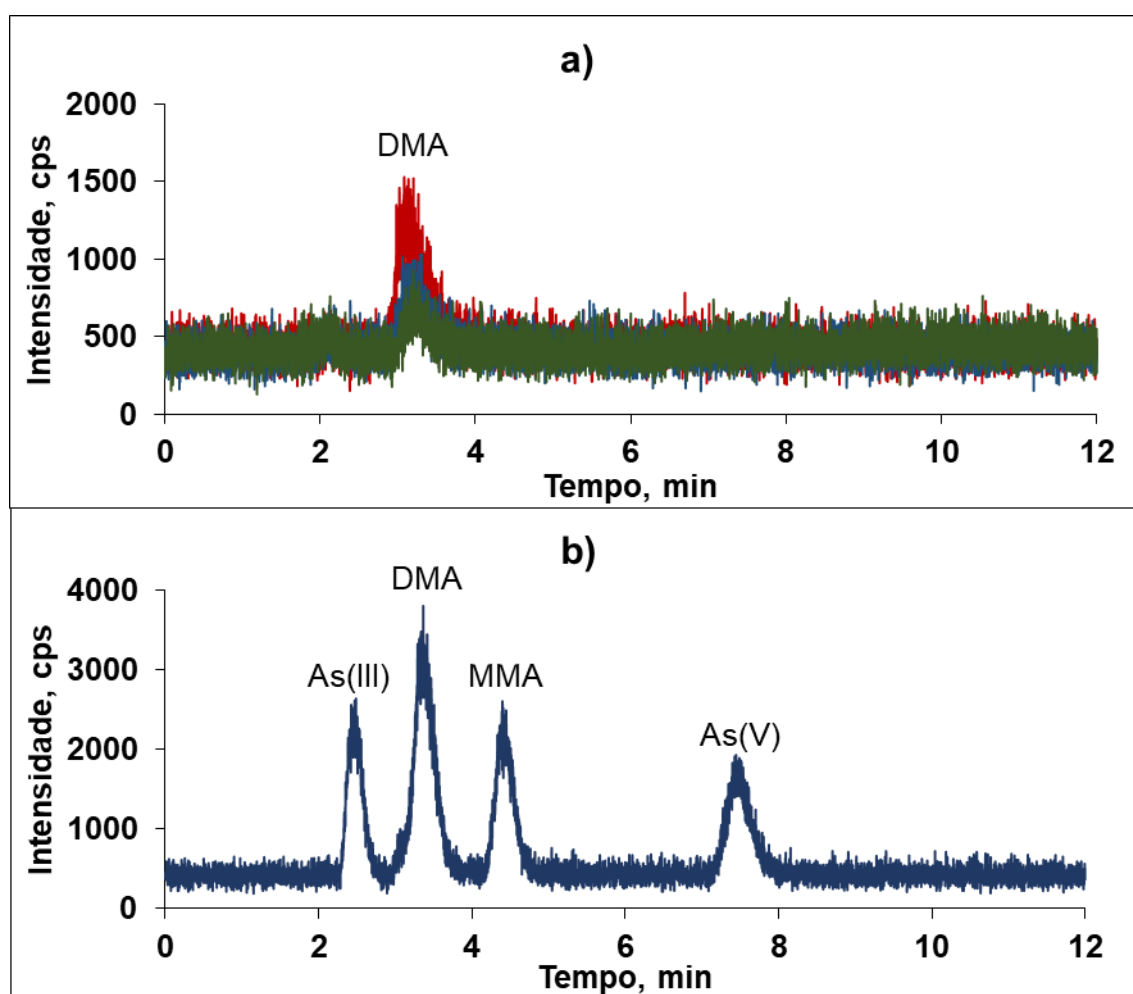
Fonte: Autor.

Com base no cromatograma apresentado na Figura 21, é possível concluir que realmente há uma influência do ácido acético, que interfere até no pico de As(V). Assim sendo, é possível que a espécie de As desconhecida encontrada por Huang *et al.* (2012) em vinagre de vinho seja apenas a interferência do ácido acético, assim como demonstrado no presente trabalho. Trata-se, portanto, de uma influência do carbono proveniente do acetato, que coeluiu durante e após a eluição do As(V). Neste contexto, o efeito do etanol sobre o MMA, discutido anteriormente, também pode ser devido à colueluição do etanol retido na coluna.

Além disso, com propriedades físicas semelhantes ao etanol, outro álcool muito presente em extratos obtidos a partir de amostras sólidas para a análise de especiação de As é o metanol. Sendo assim, com o intuito de investigar a possível

influência do metanol, foram realizados testes análogos aos realizados para o ácido acético, ainda que o metanol não estivesse conhecidamente presente nas amostras alvo deste trabalho. Os cromatogramas obtidos para o metanol são apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos para soluções preparadas na fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com pH 6,00; em (a) apenas solução de fase móvel com adição de metanol a (--) 0,5%; (--) 1,0% e (--) 2,0% (v v^{-1}) e em (b) solução de referência (--) contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e adição de metanol a 1,0% (v v^{-1}).

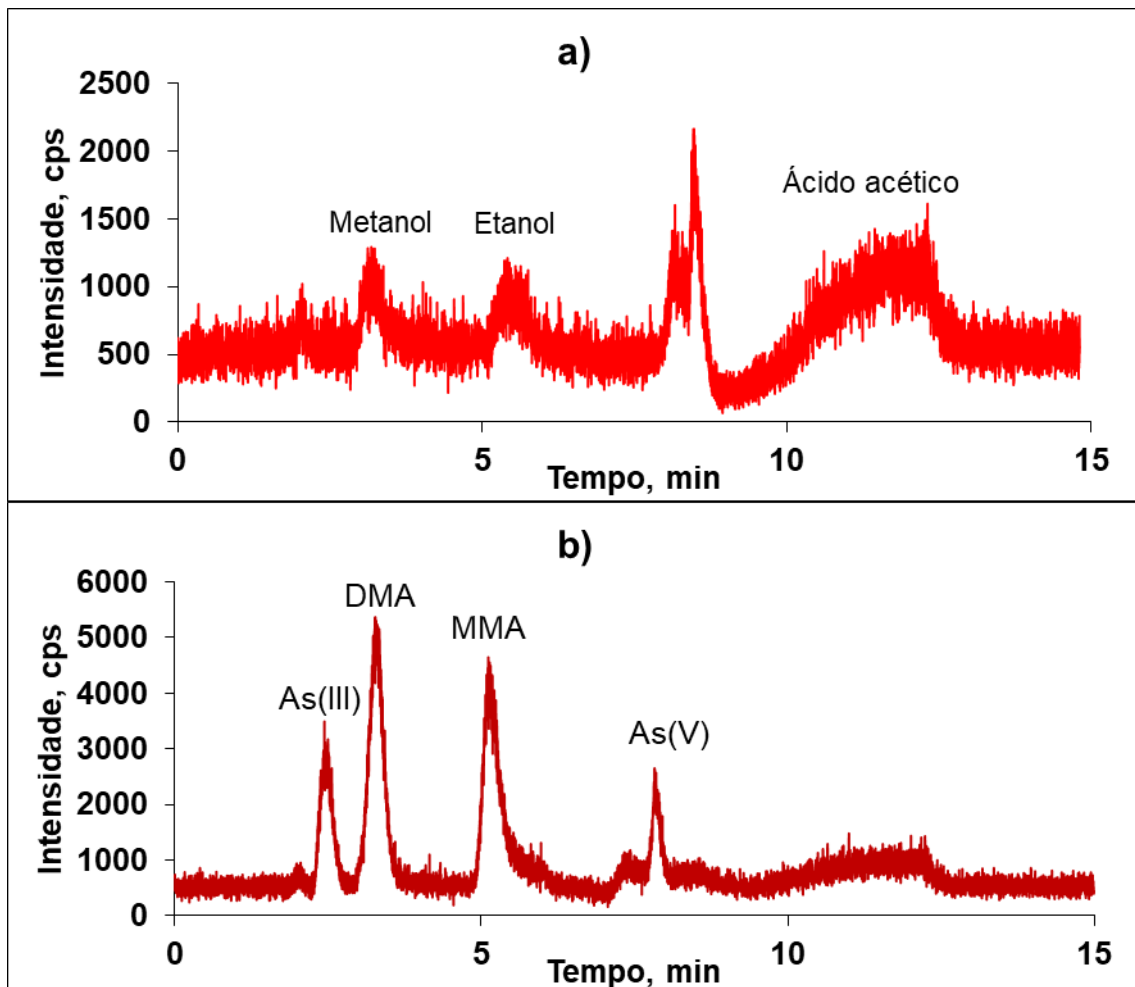


Fonte: Autor.

Nos cromatogramas mostrados na Figura 22 é possível observar que o metanol proporciona picos menos estreitos que o verificado para etanol (Figura 19), porém, com tempo de retenção menor, interferindo agora sobre a espécie DMA, como pode ser verificado na Figura 22b, aumentando a intensidade do sinal do DMA. Da mesma forma, acredita-se que tal incremento do pico recai sobre a influência do carbono sobre o As em determinações por ICP-MS. Por fim, para reforçar o argumento de que as

moléculas orgânicas metanol, etanol e ácido acético possuem interações físicas com a coluna de troca aniônica utilizada foi analisada uma solução onde as três substâncias foram adicionadas, com e sem adição dos analitos, cujos cromatogramas são mostrados na Figura 23.

Figura 23 -Cromatogramas obtidos para soluções preparadas com fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com pH 6,00; em (a) apenas fase móvel com adição de metanol, etanol e ácido acético, todos em concentração $1,0\%$ (v v^{-1}) e em (b) solução de referência contendo As(III), DMA, MMA e As(V) com $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, com adição dos três solventes na concentração de $1,0\%$ (v v^{-1}).



Fonte: Autor.

Neste estudo foi possível comprovar que os compostos orgânicos avaliados eluem separadamente durante a análise de especiação, em ordem, metanol, etanol e ácido acético, interferindo respectivamente sobre as espécies DMA, MMA e As(V), conforme observado na Figura 23. Sendo assim, é possível concluir que as moléculas orgânicas possuem diferentes graus de interação com a coluna de troca aniônica. O metanol interage menos com a coluna, uma vez que a nuvem eletrônica deslocada

para o oxigênio da hidroxila é menos intensa, uma vez que só há um carbono deslocando a nuvem eletrônica em direção ao grupo funcional por efeito indutivo estático positivo (+I). Dessa forma, pelo aumento da intensidade do efeito +I (etila>metila), explica-se a maior interação do etanol com a coluna e por isso acaba eluindo a posteriori. Ainda relacionado a efeito eletrônico, o ácido acético, por sua vez, possui maior densidade de carga negativa deslocada sobre o grupo funcional, por conter dois oxigênios, formando carboxilato em vez de alcoolatos. Além disso, ao contrário dos álcoois, o pH 6,00 da fase móvel causa a desprotonação da carboxila. Esses fatores fazem com que o ácido acético demore mais tempo para eluir da coluna, por interagir mais fortemente com a mesma (SOLOMONS e FRYHLE, 2009).

5.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As NOS DERIVADOS DE ARROZ

Os resultados da análise de especiação de As por LC-ICP-MS, empregando-se uma coluna de troca aniônica *Hamilton* PRP-X100, com solução de fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹ em pH 6,00 como fase móvel a uma vazão de 1,00 mL min⁻¹, foram obtidos para todas as amostras diluídas na mesma fase móvel. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 7 a 16 para as amostras diretamente diluídas na fase móvel, evaporadas e reconstituídas nesta fase móvel, liofilizadas e reconstituídas na referida fase móvel.

No caso das amostras alcoólicas simplesmente diluídas, ainda avaliou-se a determinação das espécies de As mediante calibração com ajuste de matriz para teor alcoólico similar ao das amostras diluídas, tendo-se em vista a influência de etanol sobre o MMA, referida no item 5.3.6. E, no caso das amostras de leite e vinagre, também determinou-se as espécies mediante calibração por adição de padrão.

Para as medidas efetuadas por calibração externa, sem ou com ajuste de matriz, o LD e LQ foram determinados para cada espécie a partir do desvio padrão da concentração obtida após dez medidas dos brancos analíticos, considerando-se o fator de multiplicação 3 para o LD e 10 para o LQ. Os valores de LD e LQ obtidos em cada situação são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos para LD e LQ das espécies de As.

Calibração	As, $\mu\text{g L}^{-1}$							
	As(III)		DMA		MMA		As(V)	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Externa sem ajuste de matriz para diluição (todas as amostras)	0,10	0,32	0,11	0,37	0,08	0,25	0,13	0,43
Externa com ajuste de matriz para cervejas diluídas	0,05	0,16	0,08	0,25	2,36	7,88	0,21	0,69
Externa com ajuste de matriz para saquê diluído	0,13	0,40	0,13	0,39	3,12	10,1	0,17	0,49
Externa sem ajuste de matriz para amostras evaporadas	0,04	0,12	0,04	0,15	0,04	0,12	0,11	0,36
Externa sem ajuste de matriz para amostras liofilizadas	0,17	0,50	0,15	0,50	0,08	0,27	0,07	0,24

Fonte: Autor.

5.4.1 Análise de especificação de As após diluição das amostras

Seguindo-se os trabalhos de Moreira *et al.* (2011) e de Huang *et al.* (2012), a primeira proposta de preparo das amostras foi a simples diluição das mesmas na fase móvel já referida. Para tanto, a diluição prévia, ao invés da injeção direta das amostras, foi necessária para prevenir o efeito do cloro contido nas amostras, que forma íon poliatômico com Ar com a mesma m/z do As no ICP, como mencionado no item 5.2. Sendo assim, as amostras foram diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) para obter a menor concentração possível de cloro, mantendo a uma boa razão sinal/linha base para as espécies a fim não piorar o LD e LQ. Maiores diluições impediram a detecção das espécies, visto que a concentração das mesmas ficava abaixo do LD.

Na Tabela 8 são apresentadas as concentrações das espécies As(III), As(V), DMA e MMA, determinadas por LC-ICP-MS, com troca de íons, após a diluição das amostras na fase móvel. A soma das concentrações das espécies é comparada com a do As total, determinado por ICP-MS, nas amostras digeridas.

Tabela 8 - Análise de especificação de As por LC-ICP-MS após diluição das amostras na fase móvel, na proporção 1:2 (v v⁻¹).

Amostras	As, µg L ⁻¹					As total (ICP-MS)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Soma	
Leite de arroz comum	6,0 ± 0,2	16,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2	4,20 ± 0,04	27,5 ± 0,4	29,5 ± 1,2
Leite de arroz integral	12,5 ± 0,1	22,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	43,3 ± 0,3	46,9 ± 2,0
Cerveja I	2,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	4,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	8,4 ± 0,2	5,0 ± 0,4
Cerveja II	1,2 ± 0,3	0,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	5,2 ± 0,4	4,0 ± 0,8
Cerveja III	0,3 ± 0,1	< 0,11*	4,0 ± 0,2	< 0,13*	4,3 ± 0,2	0,7 ± 0,5
Cerveja IV	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,4	1,1 ± 0,3	4,0 ± 0,5	1,9 ± 0,2
Cerveja V	0,6 ± 0,1	< 0,11*	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,3 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Cerveja VI	0,5 ± 0,1	< 0,11*	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,8
Cerveja VII	0,2 ± 0,1	< 0,11*	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	2,7 ± 0,1
Cerveja VIII	0,2 ± 0,1	< 0,11*	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1
Cerveja IX	0,5 ± 0,1	< 0,11*	1,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,8
Cerveja X	< 0,10*	< 0,11*	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Cerveja XI	0,4 ± 0,1	< 0,11*	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2	3,8 ± 0,3	1,8 ± 0,4
Cerveja XII	0,2 ± 0,1	< 0,11*	1,2 ± 0,1	< 0,13*	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Cerveja XIII	0,4 ± 0,1	< 0,11*	1,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,9
Saquê	0,5 ± 0,1	8,3 ± 0,1	11,1 ± 0,3	0,3 ± 0,2	20,3 ± 0,4	13,0 ± 1,1
Vinagre de arroz	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,1	3,7 ± 0,8	5,3 ± 0,8	5,3 ± 0,4

*LD

Fonte: Autor.

Na Tabela 8, para o leite de arroz observa-se uma pequena diferença sistemática entre a soma das espécies e o As total, que pode estar associada a perdas cromatográficas (MICHALKE, 2002). Ainda assim, para leite de arroz e vinagre de arroz a soma das espécies não tem diferença significativa do As total (teste *t* a um nível de confiança de 95%). A exatidão dos resultados obtidos para as espécies de As foi avaliada mediante testes de recuperação dos analitos como indicado na Tabela 9.

Tabela 9 – Recuperações das espécies de As adicionadas às amostras diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel de modo a concentrações adicionais de 1,0 e 5,0 µg L⁻¹ de As para as mesmas.

Amostras	Espécies			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Leites de arroz	100 – 112%	80 – 82%	104 – 116%	74 – 107%
Cervejas	90 – 116%	87 – 112%	80 – 143%	82 – 111%
Saquê	103 – 114%	91 – 104%	50 – 213%	112 – 133%
Vinagre de arroz	90 – 101%	112 – 114%	97 – 112%	108 – 121%

Fonte: Autor.

As recuperações foram satisfatórias para a maioria das espécies, na maioria das amostras (SHABIR, 2003). No entanto, destaca-se a menor recuperação do DMA nas amostras de leite de arroz, podendo estar associada a uma possível interferência. Além disso, houve variações e recuperações bem acima de 100% para o MMA nas amostras alcoólicas, provavelmente em função da já esperada interferência do etanol. Nota-se ainda uma recuperação mais elevada de As(V) no vinagre de arroz, possivelmente em função da interferência do ácido acético presente nesta amostra, conforme discutido no item 5.3.7 deste trabalho.

A não concordância entre o somatório das concentrações das espécies e a concentração de As total para a maioria das amostras alcoólicas, como observado na Tabela 8, pode estar relacionada com o efeito do etanol sobre o MMA, discutido no item 5.3.6 do presente trabalho. Para tanto, buscando-se contornar este problema, procedeu-se a análise de especiação para as amostras de cerveja mediante calibração externa, com adição de etanol às soluções de calibração (ajuste de matriz), de tal forma que contivessem 1,5% desse álcool, equivalente a sua concentração nas amostras diluídas 1:2 (v v⁻¹). De modo similar, procedeu-se a análise de especiação de As no saquê mas, com 5,2% (v v⁻¹) de etanol nas soluções de calibração. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Análise de especiação de As nas amostras de cerveja mediante calibração externa com ajuste de matriz; 1,5% (v v⁻¹) de etanol para a cerveja e 5,2% (v v⁻¹) de etanol para o saquê.

Amostras	As, µg L ⁻¹					As total (ICP-MS)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Soma	
Cerveja I	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	< 2,36*	2,3 ± 0,2	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,4
Cerveja II	0,8 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	4,0 ± 0,8
Cerveja III	0,4 ± 0,1	< 0,08*	2,9 ± 0,3	< 0,21*	3,3 ± 0,3	0,7 ± 0,5
Cerveja IV	0,4 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Cerveja V	0,2 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Cerveja VI	0,1 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,8
Cerveja VII	0,2 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1
Cerveja VIII	0,3 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Cerveja IX	0,3 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,8
Cerveja X	0,1 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,1
Cerveja XI	0,5 ± 0,2	< 0,08*	< 2,36*	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,4
Cerveja XII	< 0,05*	< 0,08*	< 2,36*	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Cerveja XIII	0,2 ± 0,1	< 0,08*	< 2,36*	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,9
Saquê	0,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1	< 3,12*	1,0 ± 0,1	10,8 ± 0,2	13,0 ± 1,1

*LD

Fonte: Autor.

Observando-se os dados mostrados nas Tabelas 8 e 10, conclui-se que a interferência do etanol sobre o MMA foi contornada mediante calibração com ajuste de matriz, com respeito à concentração de etanol. Na Tabela 10 pode ser observado que a soma da concentração das espécies concorda com a concentração de As total, com poucas exceções.

No caso da Cerveja III, foram observados picos para as espécies avaliadas nesse estudo. Entretanto, através da determinação de As total foi verificada uma quantidade As muito baixa, o que condiz com o resultado obtido para a espécie As(III). Nesse sentido, no rótulo da referida cerveja constava que se tratava de uma bebida mista de cerveja, contendo outras bebidas alcoólicas, contando com um teor alcoólico total de 7,9% (v v⁻¹), o que explica a aparente concentração de MMA, superior ao LD (2,36 µg L⁻¹).

Além disso, tanto para a determinação com ajuste de matriz, quanto sem o referido ajuste, para as cervejas II, VI, IX, XII e XIII a soma das concentrações das espécies foi inferior ao As total. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos para a

maioria das amostras simplesmente diluídas na fase móvel, há uma limitação associada possivelmente a uma interferência física causada pelas matrizes ricas em carbono. Com base em observação visual, acredita-se que tal limitação esteja associada ao acúmulo de carbono (fuligem) no cone de amostragem do equipamento de ICP-MS, o que reduz gradualmente a intensidade do sinal do As nas determinações por LC-ICP-MS. Essa suposição foi comprovada mediante comparação da intensidade dos picos das espécies de As em soluções de calibração, medidos no início do trabalho e ao final do mesmo. Observou-se um decréscimo de área dos picos em aproximadamente 40%, para todas as espécies de As, após cerca de 16 horas de trabalho ininterrupto. Portanto, apesar da clara vantagem de um método simples de preparo de amostra, há uma limitação na robustez do mesmo. Desse modo, para contornar a interferência ocasionada pela deposição de carbono na interface do instrumento de ICP-MS, a calibração deve ser refeita mais seguidamente.

Para as amostras não alcoólicas e a ácida, como já mencionado, optou-se também pela calibração por adição de padrão, para a validação dos resultados da análise de especiação de As obtidos mediante calibração externa, além dos testes de recuperação dos analitos. Sendo assim, alíquotas das amostras foram diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) na fase móvel utilizada, contando com a adição de concentrações crescentes das espécies As(III), DMA, MMA e As(V), para obter 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu g L^{-1}$ de As. Os resultados obtidos na análise das amostras não alcoólicas e ácida, em que a calibração foi por adição de padrão, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise de especiação de As em leite de arroz e vinagre de arroz, com calibração por adição de padrão.

Amostras	As, $\mu g L^{-1}$					As total (ICP-MS)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Soma	
Leite de arroz comum	5,6 \pm 1,2	17,5 \pm 4,0	1,6 \pm 0,8	4,7 \pm 0,4	29,4 \pm 4,3	29,5 \pm 1,2
Leite de arroz integral	9,6 \pm 1,5	24,6 \pm 1,4	2,0 \pm 0,3	7,3 \pm 0,3	43,5 \pm 2,1	46,9 \pm 2,0
Vinagre de arroz	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,4	0,3 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	5,3 \pm 0,6	5,3 \pm 0,4

Fonte: Autor.

Os resultados apresentados na Tabela 11 foram comparados com os apresentados na Tabela 8, para as mesmas amostras. Em todos os casos as médias

obtidas para as quatro espécies e para a soma das respectivas concentrações foram comparadas através de teste *t* a um nível de confiança de 95% e não foram observadas diferenças significativas entre elas. Além disso, também foram comparados os resultados dos somatórios das espécies, para a calibração externa e por adição de padrão, com o resultado obtido para As total. Neste caso também não foram observadas diferenças significativas entre os resultados comparados. Isso comprova a viabilidade do método de análise de especiação de As em leite de arroz e vinagre de arroz, envolvendo um simples procedimento de preparo da mesma, ou seja, diluindo na fase móvel.

Assim sendo, é possível a análise de especiação de As sem a necessidade de um preparo moroso da amostra, ao contrário do que fora feito por Meharg *et al.* (2008a), para leite de arroz que, para o mesmo propósito, empregaram 1 mL de hexano para a extração das espécies, seguido da adição de ácido nítrico 1% (v v⁻¹) para precipitação de proteínas. Após, essa mistura teve que ser filtrada para a análise de especiação de As. Ainda em relação ao presente estudo, os resultados obtidos na análise de especiação de As são condizentes, uma vez que a concentração de iAs chega a quase 50% do As total presente, sendo o restante atribuído principalmente a DMA, assim como citado por Meharg *et al.* (2008).

Com relação às cervejas analisadas, os resultados obtidos são similares aos relatados por Huang *et al.* (2012), no qual as concentrações das espécies inorgânicas de As foram predominantes, sendo seguidas por DMA. A concentração de MMA foi abaixo do LD em todos os casos. Contudo, os resultados obtidos contrapõem-se aos relatados por Herce-Pagliai *et al.* (1999), que foram obtidos por LC-HG-AAS, em que as maiores concentrações foram atribuídas às espécies MMA e DMA nas cervejas.

Em relação ao saquê, neste estudo a espécie predominante foi o DMA, ao contrário do que foi determinado por Huang *et al.* (2012) que observaram predominância das espécies inorgânicas no saquê analisado. Essa diferença pode estar ligada a diferentes fabricantes e, principalmente, a diferentes origens do arroz utilizado como matéria prima. Entretanto, destaca-se que tanto no presente estudo, quanto naquele conduzido por Huang *et al.* (2012), as três espécies predominantes são As(III), DMA e As(V), enquanto o MMA não é detectado, seguindo o que se encontra no arroz.

A única referência encontrada para o vinagre de vinho analisado por LC-ICP-MS também é de autoria de Huang *et al.* (2012). No referido estudo, os autores

declaram que a única espécie conhecida encontrada foi As(III), que segundo eles correspondia a aproximadamente 20% de uma concentração total de As de $40 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo o restante atribuído a uma espécie “desconhecida” em tempo de retenção posterior ao As(V) no respectivo cromatograma. No entanto, como já foi citado, neste trabalho não é mencionado se o As total foi determinado de outra forma, que não a soma das espécies. Por isso, no presente estudo esperava-se uma concentração mais elevada de As(V) no vinagre de arroz. No presente estudo também foi observado um pico desconhecido após o As(V), no cromatograma, o que já foi mostrado no item 5.3.7, tratando-se de uma interferência advinda da presença de ácido acético na matriz, ainda que não tenha prejudicado a determinação das espécies de As. Por sua vez, o presente trabalho obteve concentração de As total similar ao obtido por Santos *et al.* (2017) em vinagre por HG-AAS, sendo que os autores atribuem 30% da concentração de As total a As(III).

Para todas as amostras derivadas de arroz analisadas, o perfil de concentração das espécies de As é similar ao que se observa para os extratos do grão de arroz, conforme a revisão no item 2.2 deste trabalho. Além da diluição envolvida na produção desses derivados, a diferença também reside no fato que as concentrações das espécies em seus derivados líquidos são inferiores, o que demonstra que o processo de manufatura desses produtos tende a eliminar boa parte do As existente na superfície dos grão, possivelmente em função das etapas prévias de lavagem, corroborando com o proposto por Althobiti *et al.* (2018), que verificou a remoção de até 43% do As após a lavagem do arroz.

Com base na resolução RDC nº 42/2013 (ANVISA, 2013) para o limite para As total em arroz e seus derivados ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), foi possível constatar que o As em todas as amostras analisadas está bem abaixo deste limite, considerando que a densidade das mesmas variou entre 0,9950 e $1,1153 \text{ kg L}^{-1}$. No entanto, essa legislação não é clara sobre os tipos de derivados. Por isso, na comparação com outras categorias de alimentos, a concentração encontrada está próxima do limite; o limite para As total no leite fluído é bem menor ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) e, nesse sentido, o teor de As total no leite de arroz integral se aproximou do limite estabelecido, o que pode representar um alerta. Do mesmo modo, as bebidas alcoólicas avaliadas poderiam ser comparadas com bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, cujo limite é mais restritivo do que para os derivados de arroz (máximo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$), ainda que os teores encontrados nas amostras analisadas no presente trabalho sejam bem inferiores. Por

esse caminho, em seu estudo para leite de arroz, Meharg *et al.* (2008a) adotaram como referência $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, valor definido pelo Guia para a Qualidade da Água Potável da OMS (*Guidelines for drinking-water quality*) (WHO, 2008). Ambas as amostras de leite de arroz analisadas no presente trabalho possuem concentrações superiores a este limite, sendo que o iAs, mais tóxico, já superaria esse limite. Além do leite de arroz, a concentração de As total no saquê foi superior ao limite estabelecido para a água potável.

Segundo Souza *et al.* (2015), a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) determinou que a concentração para limite de confiança inferior à dose de referência ($\text{BMDL}_{0,1}$) de As para ingestão deve ser de 0,3 a $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, por dia, para a avaliação e caracterização dos riscos relacionados a exposição. A OMS (WHO, 1993), por sua vez, estabelece que o limite seguro para a ingestão diária de As não pode ultrapassar $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corporal. Com base no limite estabelecido pela OMS, pode-se estimar que um indivíduo adulto com aproximadamente 70 kg não pode ingerir, por dia, uma quantidade de As superior a $140 \mu\text{g}$, enquanto que para uma criança com aproximadamente 15 kg, esse limite diário passa a ser de $30 \mu\text{g}$. Sendo assim, tendo-se em vista a baixa concentração de As encontrada nas bebidas alcoólicas, valores máximos em torno de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ na cerveja e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ no saquê, um adulto poderia ingerir em um mesmo dia, com segurança em relação ao As, até 35 L da cerveja ou até 10 L de saquê. Ou seja, são quantias improváveis e, portanto, tratam-se de concentrações aparentemente seguras. No entanto, no leite de arroz, as concentrações são maiores e, geralmente, é um produto mais consumido por crianças. Sendo assim, com base na amostra de leite de arroz integral, que tem mais As, quase de $47 \mu\text{g L}^{-1}$, estima-se que uma criança de 15 kg possa ingerir, com segurança, no máximo 0,6 L desse leite em um dia; isto que equivale a cerca de dois copos de leite de arroz integral em um dia. Neste caso, portanto, acredita-se que uma criança está propensa a doses tóxicas de As, dependendo do leite que é ingerido.

Os dados acima reforçam a necessidade de leis mais claras no que tange à ingestão de As, sobretudo, quando se relacionam a produtos destinados, principalmente, a crianças. Outra falha da OMS é não considerar a diferença de toxicidade das espécies de As, devendo estabelecer diferentes limites para as diferentes espécies. Isto reforça a importância de se desenvolverem métodos confiáveis para a análise de especiação de As em derivados líquidos de arroz.

Na Tabela 12 são citadas as equações de regressão linear das curvas de calibração obtidas para a calibração externa com e sem ajuste de matriz e calibração por adição de padrão. Em todos os casos, foi observado que o coeficiente de determinação (R^2) foi igual ou superior a 0,9998.

Tabela 12 – Equações de regressão linear das curvas de calibração utilizadas na análise de especiação de As em leite de arroz, cervejas, saquê e vinagre de arroz.

Calibração	Espécies			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Externa	$Y = 554,72 X + 26,905$	$Y = 590,69 X + 36,605$	$Y = 680,10 X + 34,085$	$Y = 599,05 X + 56,057$
Externa com etanol 1,5% ^a	$Y = 159,39 X + 18,591$	$Y = 171,04 X + 11,835$	$Y = 173,14 X + 442,04$	$Y = 154,01 X + 16,171$
Externa com etanol 5,2% ^a	$Y = 147,45 X + 6,1402$	$Y = 143,9 X + 6,5669$	$Y = 204,56 X + 650,74$	$Y = 140,67 X + 1,4223$
Adição em leite de arroz comum ^b	$Y = 941,86 X + 2056,6$	$Y = 691,85 X + 4807,8$	$Y = 937,66 X + 476,68$	$Y = 771,96 X + 1283,6$
Adição em leite de arroz integral ^b	$Y = 1538,5 X + 4915,6$	$Y = 816,06 X + 6696,8$	$Y = 1241,8 X + 820,89$	$Y = 891,48 X + 2174,4$
Adição em vinagre de arroz ^b	$Y = 429,36 X + 160,64$	$Y = 514,77 X + 184,78$	$Y = 544,92 X + 86,65$	$Y = 554,99 X + 927,22$

Onde Y: área (contagens); X: $\mu\text{g L}^{-1}$ As; a: ajuste de matriz e b: adição de padrão.

Fonte: Autor.

Para o mesmo tipo de calibração, na Tabela 12 observa-se que as equações tem diferentes coeficientes angulares, no entanto isto não significa que a sensibilidade é diferente, uma vez que as determinações foram executadas em dias diferentes, o que interfere na condição instrumental para as análises.

5.4.2 Análise de especiação de As após evaporação das amostras

No intuito de se eliminar a matriz da amostra, foi avaliada a possibilidade de determinação das espécies As(III), DMA, MMA e As(V) por LC-ICP-MS, após a evaporação das amostras por aquecimento convencional ao invés da diluição na fase móvel.

Para tanto, alíquotas de 10 mL das amostras dos leites de arroz (comum e integral), das cervejas (I, II e III), do saquê e do vinagre de arroz, foram evaporadas,

como descrito no item 4.4.2.2. Os resultados obtidos para as amostras evaporadas são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise de especiação de As por LC-ICP-MS nas amostras evaporadas e reconstituídas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, em pH = 6,00.

Amostras	As, µg L ⁻¹					As total (ICP-MS)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Soma	
Leite de arroz comum	0,4 ± 0,1	10,7 ± 0,7	< 0,04*	4,9 ± 0,2	16,0 ± 0,7	29,5 ± 1,2
Leite de arroz integral	1,0 ± 0,2	17,7 ± 1,0	0,1 ± 0,1	9,8 ± 0,5	28,6 ± 1,2	46,9 ± 2,0
Cerveja I	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,1 ± 0,4	3,6 ± 0,4	5,0 ± 0,4
Cerveja II	1,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	< 0,04*	0,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4	4,0 ± 0,8
Cerveja III	0,3 ± 0,1	< 0,04*	< 0,04*	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,5
Saquê	0,3 ± 0,1	7,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	8,1 ± 0,2	13,0 ± 1,1
Vinagre	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2	5,3 ± 0,4

* LD.

Fonte: Autor.

As concentrações das espécies de As, nas amostras que foram evaporadas, foram determinadas através de calibração externa para cada espécie e se pode observar na Tabela 13 que em todos os casos houve perda das espécies de As. Isto porque a soma das concentrações das espécies é menor que a concentração de As total. Essa perda pode ser atribuída a dois motivos não excludentes entre si; possível adsorção das espécies de As nas paredes dos frascos de polipropileno, tal como relatado em estudos sobre adsorção de espécies aniônicas de As em silício (SWEDLUND e WEBSTER, 1999) e em polímeros orgânicos (BAPKAN *et al.*, 2010) e ao possível carregamento das espécies pelo solvente evaporado.

No entanto, apesar de se esperar uma perda similar para todas as espécies, aparentemente a perda de As(III) foi maior e a de As(V) foi menor em relação às demais. É difícil concluir que necessariamente isso tenha ocorrido pela maior volatilidade e/ou capacidade de adsorção do As(III) em relação ao As(V). A hipótese mais provável é a possível oxidação do As(III) a As(V), considerando-se que os frascos foram mantidos abertos e em temperatura mais elevada. A provável oxidação do As(III) para As(V) nestas condições foi relatada por Lindemann *et al.*(2000) e Pizarro *et al.* (2003b).

Para avaliar a exatidão dos resultados obtidos, simultaneamente foram evaporadas alíquotas das soluções das amostras diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel, com adição das espécies de As, obtendo-se concentrações adicionais de 1,0 e 5,0 µg L⁻¹ de As nas soluções das amostras. Os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados dos testes de recuperação dos analitos adicionados às amostras; 1,0 e 5,0 µg L⁻¹ de As para cada espécie nas amostras diluídas 1:2 (v v⁻¹) na fase móvel, antes da evaporação.

Amostras	Espécies			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Leites de arroz	54 – 71%	37 – 52%	44 – 72%	82 – 120%
Cervejas	8 – 99%	30 – 81%	19 – 44%	34 – 83%
Saquê	72 – 88%	64 – 98%	40 – 44%	79 – 92%
Vinagre	11 – 22%	25 – 60%	16 – 34%	37 – 89%

Fonte: Autor.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 14) é possível afirmar que houve perdas das espécies durante o procedimento de evaporação, o que dificulta o emprego deste método de preparo das amostras para a posterior análise de especificação de As. Além disso, os cromatogramas revelaram que não houve completa eliminação dos interferentes, etanol e ácido acético, já referidos previamente

5.4.3 Análise de especificação de As após liofilização das amostras

Considerando que no processo de liofilização as amostras não ficam sujeitas à temperatura elevada, foi avaliado o emprego da liofilização das mesmas amostras envolvidas no estudo da evaporação. Nesse sentido, como mencionado, foram transferidas alíquotas de 10 mL das amostras em frascos de polipropileno, que foram previamente congeladas. A seguir essas alíquotas foram submetidas à liofilização durante 5 ciclos de 15 horas, até que não fosse mais observada a presença do solvente. Após as 75 horas de liofilização as amostras foram reconstituídas com fase móvel até o mesmo volume e foram submetidas à análise de especificação de As por

IC-ICP-MS, seguindo a mesma metodologia das demais determinações. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise de especiação de As por IC-ICP-MS nas amostras liofilizadas e reconstituídas na fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹, em pH = 6,00.

Amostras	As, µg L ⁻¹					As total (ICP-MS)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Soma	
Leite de arroz comum	3,6 ± 0,5	11,7 ± 0,6	0,3 ± 0,1	3,8 ± 0,4	19,3 ± 0,8	29,5 ± 1,2
Leite de arroz integral	9,8 ± 0,3	16,8 ± 0,8	0,4 ± 0,1	5,3 ± 0,2	32,3 ± 0,9	46,9 ± 2,0
Cerveja I	2,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	< 0,08*	0,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	5,0 ± 0,4
Cerveja II	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,0 ± 0,8
Cerveja III	0,6 ± 0,1	< 0,15*	< 0,08*	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,5
Saquê	0,5 ± 0,1	7,8 ± 0,2	< 0,08*	0,4 ± 0,1	8,8 ± 0,2	13,0 ± 1,1
Vinagre	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	< 0,08*	2,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2	5,3 ± 0,4

* LD.

Fonte: Autor.

Os resultados apresentados na Tabela 15 também foram obtidos mediante calibração externa para as quatro espécies estudadas. Com base nos resultados, pode-se afirmar que as perdas foram menores do que na evaporação, porém, houve diferença significativa entre os resultados obtidos pela liofilização e os obtidos pela simples diluição das amostras (teste *t* com intervalo de confiança de 95%).

Diferentemente do que foi observado nas evaporações, na liofilização a perda de As(V) não foi inferior às demais, o que leva a inferir que a temperatura é um fator preponderante no caso da evaporação e como na liofilização a temperatura é baixa, as perdas foram similares para todas as espécies. Por isso, neste caso, presume-se que as perdas podem estar predominantemente associadas à adsorção das espécies aos frascos de polipropileno, conforme anteriormente discutido.

A cerveja III foi a única amostra em que o somatório das médias das espécies foi superior à concentração de As total, não apresentando diferenças significativas (teste *t* com intervalo de confiança de 95%), quando as amostras foram liofilizadas. Na comparação com os resultados obtidos por diluição da amostra e determinação mediante calibração externa com ajuste de matriz, foi possível verificar que os valores encontrados para as amostras liofilizadas estejam associados a interferências

provenientes da matriz, visto que, como já discutido, esta amostra não se enquadra como uma cerveja convencional, por conter outras substâncias que, inclusive, conferem quase o dobro do teor de etanol presente nas demais cervejas.

Diferentemente da evaporação, a liofilização mostrou-se capaz de eliminar quase todas as interferências relacionadas ao etanol e ácido acético, segundo os cromatogramas obtidos. Sendo assim, acredita-se que liofilizando-se menor volume de amostra em frasco maior será possível reduzir o volume necessário de solvente e aumentar a superfície de contato do mesmo, implicando em maior eficiência de liofilização. Isto poderia implicar em um menor tempo de liofilização, reduzindo perdas e viabilizando uma análise de especificação de As mais exata para as matrizes estudadas. Esses estudos não foram feitos porque não estavam incluídos entre as propostas do presente trabalho e não haveria tempo hábil para tal. No entanto, acredita-se que com a devida otimização deste método, a análise de especificação de As seria promissora para as matrizes estudadas.

No intuito de valiar a exatidão dos resultados, também foram conduzidos testes de recuperação de todas as espécies, que foram adicionadas às alíquotas das amostras diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) na fase móvel, antes das mesmas serem liofilizadas. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados dos testes de recuperação das espécies adicionadas às amostras; com adição de 1,0 e 5,0 $\mu g L^{-1}$ de As para cada espécie nas amostras diluídas 1:2 ($v v^{-1}$) na fase móvel antes da liofilização.

Amostras	Espécies			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Leites de arroz	114 – 188%	101 – 250%	71 – 89%	96 – 146%
Cervejas	91 – 130%	82 – 117%	82 – 109%	84 – 105%
Saquê	138 – 185%	175 – 362%	120 – 136%	131 – 147%
Vinagre	74 – 83%	82 – 87%	79 – 87%	91 – 99%

Fonte: Autor.

Com exceção do vinagre, chamam a atenção, na Tabela 16, os percentuais elevados de recuperação obtidos, ao contrário do que ocorreu quando as amostras foram evaporadas. Acredita-se que estas recuperações elevadas sejam devido à diluição das amostras, o que pode influenciar fisicamente no fenômeno de liofilização

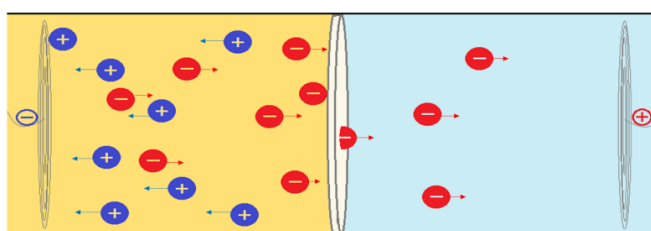
pela diferença no teor de água. Além disso, é importante mencionar que os percentuais de recuperação foram calculados a partir da diferença entre o valor da concentração na solução fortificada e o valor obtido para as soluções não fortificadas, ambas após liofilização. Ou seja, estes resultados são comparados após as diferentes perdas ocorridas na liofilização e não em relação aos valores exatos obtidos para as amostras simplesmente diluídas no item 5.4.1. Isso certamente incorreria em menores recuperações.

5.4.4 Análise de especiação de As após eletroextração através de membrana

Seguindo na proposta de um preparo das amostras que separe as espécies de As da matriz com simplicidade e livre de solventes orgânicos tóxicos foi desenvolvido um sistema de EME, tal como descrito no item 4.4.2.4 deste trabalho.

Sendo assim, como o objetivo deste estudo consiste na extração das espécies de As carregadas negativamente, a partir das matrizes, na secção 1 (Figura 5b), na qual se adiciona a “fase doadora”, foram colocadas soluções de referência ou as amostras com o devido ajuste de pH para 9,00, visto que neste pH pode ocorrer a desprotonação das quatro espécies avaliadas nesse estudo, o que é requisito para que as mesmas possam migrar por ação do campo elétrico aplicado. Nessa fase doadora foi imerso o eletrodo que foi, então, carregado negativamente (cátodo), visto que deve repelir as espécies negativas para além da SLM. Na secção oposta, denominada “fase aceptora”, foi colocada a solução da fase móvel fosfato de amônio 9,0 mmol L⁻¹ (pH = 6,00), visando a posterior injeção direta no cromatógrafo. Nessa fase aceptora é imerso o eletrodo carregado positivamente (ânodo) para atrair as espécies negativas que deverão atravessar a membrana por eletromigração, livre das interferências da matriz (Figura 24).

Figura 24 - Esquema de eletromigração na EME, sendo em amarelo a representação da fase doadora e em azul a representação da fase aceptora das espécies carregadas negativamente.

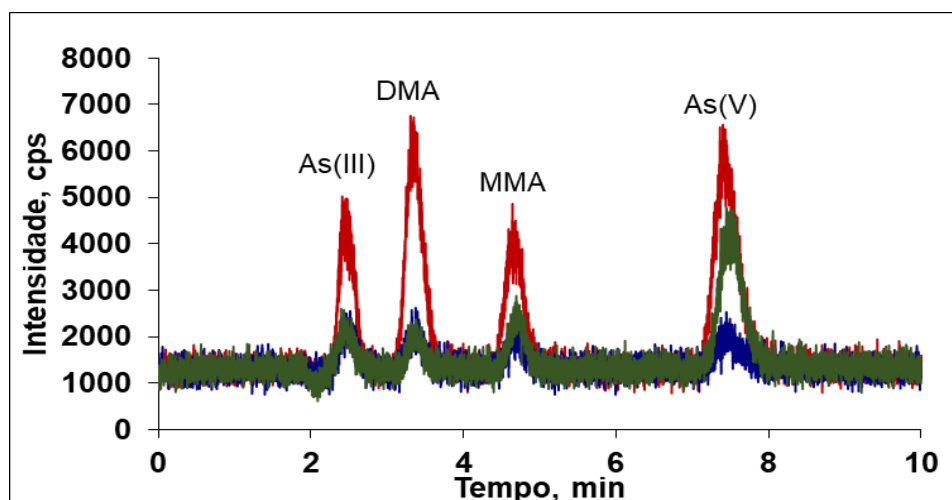


Fonte: Autor.

Para otimização do sistema, empregou-se uma solução de referência contendo as espécies As(III), As(V), DMA e MMA, com concentração equivalente a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As na fase doadora, preparadas em fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com pH 9,00. Fixando-se o tempo de eletroextração em 10 min, próximo ao tempo otimizado (12 min) para a separação cromatográfica. Avaliou-se, então, o tipo de solvente a ser suportado na membrana, sendo testados 1-octanol e etanol, nessa ordem. Conjuntamente, avaliou-se a variação na ddp aplicada, de acordo com a janela de potenciais disponível para a fonte utilizada, de 10 a 600 V.

As primeiras avaliações foram conduzidas seguindo-se estudo já realizado por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2008), utilizando-se $60 \mu\text{L}$ de 1-octanol suportado sobre a membrana, variando-se o potencial de 10 em 10 unidades, de 10 a 50 V. A partir disso, variou-se o potencial de 50 em 50 unidades, até 200 V. Por fim, testou-se o potencial de 600 V. Porém, em nenhuma das situações ocorreu migração através da membrana quando foi usado octanol na SLM. Por esse motivo, concluiu-se que o 1-octanol interrompeu a condução elétrica entre as fases, o que pode ser corroborado pela espessura da membrana. Assim sendo, empregou-se, então, um solvente com baixo grau de toxicidade e menos apolar que o 1-octanol. Desse modo, testou-se o efeito de $60 \mu\text{L}$ de etanol sobre a SLM. Avaliando-se a corrente informada na fonte de eletroforese utilizada (em μA), o menor potencial que proveu corrente entre as fases foi 50 V. Desta forma, as avaliações foram feitas a partir deste valor. A partir disso, ainda empregando-se eletrodos de tungstênio, foram avaliados os potenciais de 50, 100 e 150 V. Os melhores resultados, ou seja, maior eficiência de eletroextração, foram obtidos para o potencial de 100 V. Em todos os casos, notou-se degradação dos eletrodos, possivelmente associada à eletrólise dos mesmos. Isso se acentuou sob potencial de 150 V, provocando a diminuição da eletroextração e distorção dos picos cromatográficos (Figura 25). Por esse motivo, potenciais maiores não foram mais testados e buscou-se uma alternativa aos eletrodos de tungstênio.

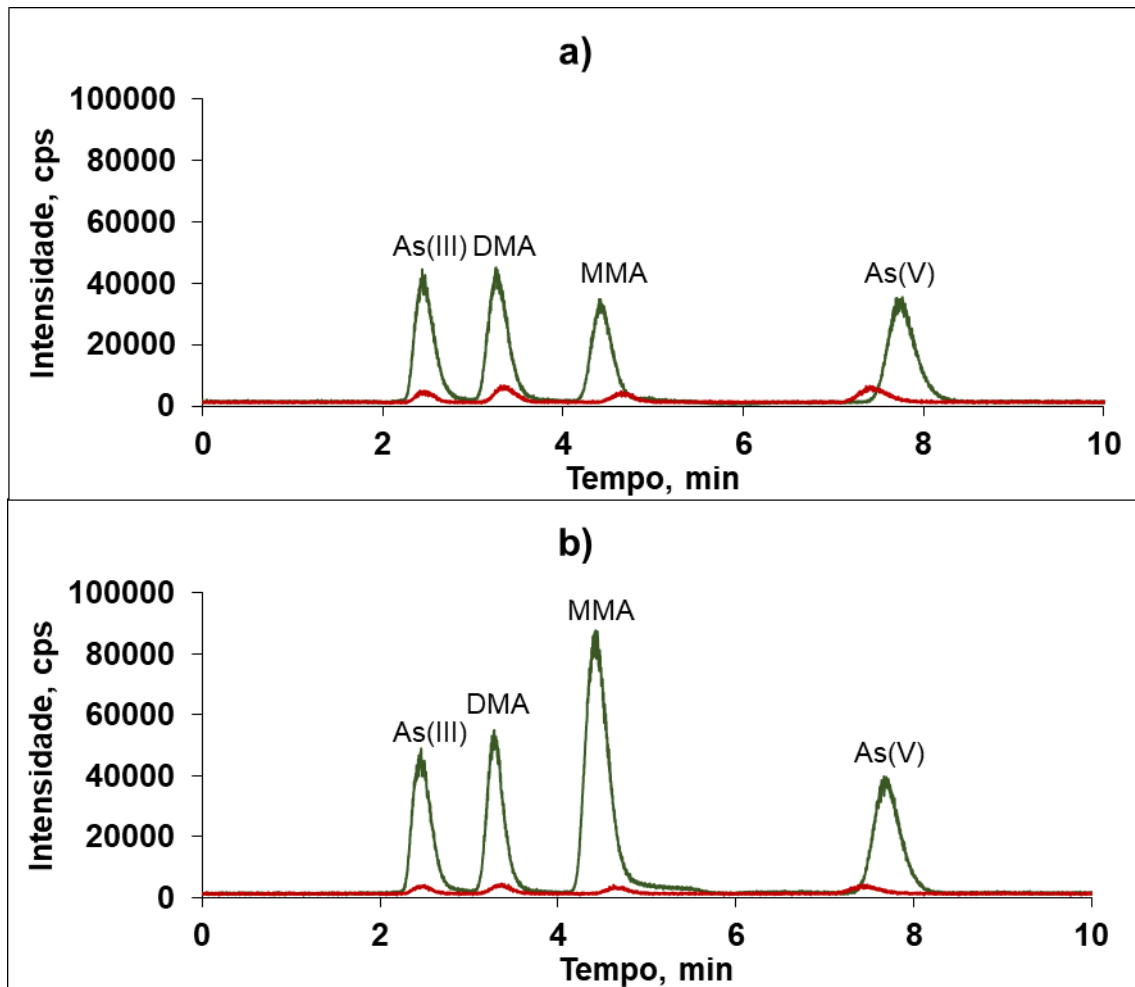
Figura 25 - Efeito da ddp empregada no eletrodo de tungstênio para EME das espécies de As em uma solução contendo as mesmas em concentração equivalente a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As. Onde: (--) 50 V; (---) 100 V e (---) 150 V.



Fonte: Autor.

Porém, ainda empregando-se eletrodos de tungstênio, procedeu-se a eletroextração de cada espécie em uma solução de referência contendo as mesmas, em concentração equivalente a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As para cada espécie, em fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (com pH 9,00) e em uma solução de referência equivalente, porém com a adição de etanol em proporção volumétrica de 4%, similar às cervejas analisadas no trabalho. Para calcular os resultados desse estudo, tomou-se por base a razão entre a área obtida para cada espécie, após 10 minutos de extração a 100 V, e a área inicial correspondente a cada espécie contida nas soluções de referência antes da extração. Na Figura 26 são apresentados os picos cromatográficos obtidos para as soluções com e sem etanol submetidas à eletroextração.

Figura 26 - Picos cromatográficos correspondentes à EME para soluções com as espécies As(III), DMA, MMA e As(V), em concentrações equivalentes a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As; em (a) sem adição de etanol e em (b) com adição de etanol 4% (v v^{-1}), ambos junto à solução de fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 9,00$). Onde: (--) fase inicial e (--) fase acceptora.



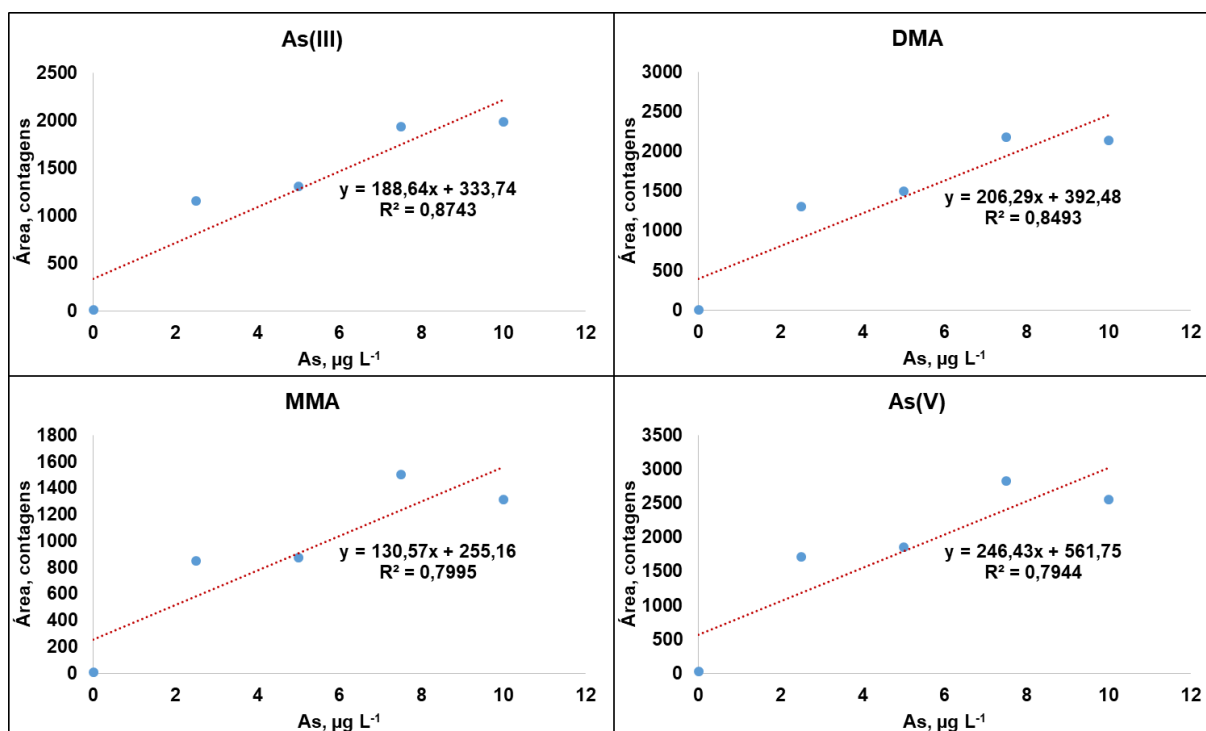
Fonte: Autor.

Para a solução de referência sem etanol a eficiência de extração foi, aproximadamente, 7,5%, 12%, 9% e 14% para as espécies As(III), DMA, MMA e As(V), respectivamente. Para a solução de referência contendo etanol a eficiência foi, respectivamente, 5%, 7%, 2% e 7%. Esses resultados, demonstraram uma baixa eficiência de extração das quatro espécies de As. Além disso, destaca-se que o percentual de extração mais baixo para MMA, no caso a partir da solução contendo etanol, que pode ter relação com a já provada influência de etanol sobre o MMA, que está presente na fase doadora, mas não na fase acceptora. Por outro lado, esta é a vantagem do método, uma vez que o etanol não migrou para junto das espécies de As, separando os analitos da matriz, como pode ser visto na Figura 26b. Por esse

motivo, as avaliações foram continuadas, pois a separação da matriz mostrou-se promissora.

Ainda empregando-se os eletrodos de tungstênio, foi investigada a quantificação dos analitos, sendo as soluções de calibração submetidas ao mesmo processo de EME que as amostras. Dessa forma, tendo-se em vista o baixo percentual de recuperação obtido, foram preparadas soluções de referência contendo as espécies de As(III), DMA, MMA e As(V), cujas concentrações eram equivalentes a 2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As. Essas soluções foram submetidas à EME, sequencialmente, sempre empregando-se SLM e eletrodos novos, para eliminar efeitos de memória. Nesse sentido, como pode ser visto na Figura 27, os resultados da calibração não foram satisfatórios, uma vez que não se conseguiu estabelecer uma tendência linear entre o aumento da concentração e o sinal analítico.

Figura 27 – Curvas de calibração elaboradas a partir do emprego de EME para soluções de calibração em fosfato de amônio 9,0 mmol L^{-1} (pH 9,00), contendo As(III), DMA, MMA e As(V).



Fonte: Autor.

Desse modo, tendo-se em vista a ineficiência dos eletrodos de tungstênio, em conjunto com a falta de robustez do sistema, investigou-se o emprego de eletrodos de platina, em formato de espiral e com diâmetro equivalente ao do tubo em “U” (Figura 5d), tal como sugerido por Orlando *et al.* (2014). Desse modo, os mesmos

testes foram repetidos com o novo eletrodo, sem, contudo, obter melhores resultados. Destaca-se, sobretudo, a dificuldade na reprodução das extrações sob uma mesma condição. Sendo assim, apesar de serem promissoras as extrações, visto que separam os analitos da matriz (Figura 28), a baixa eficiência de extração aliada à baixa reprodutibilidade determinaram o fim desse estudo, para a elaboração da tese.

Figura 28 - Cromatogramas obtidos para: (a) cerveja de arroz; (b) leite de arroz; (c) saquê e (d) vinagre de arroz. As amostras foram diluídas 1:1 ($v v^{-1}$) em fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (fase móvel, com pH 9,00) e submetidas à EME.

(continua)

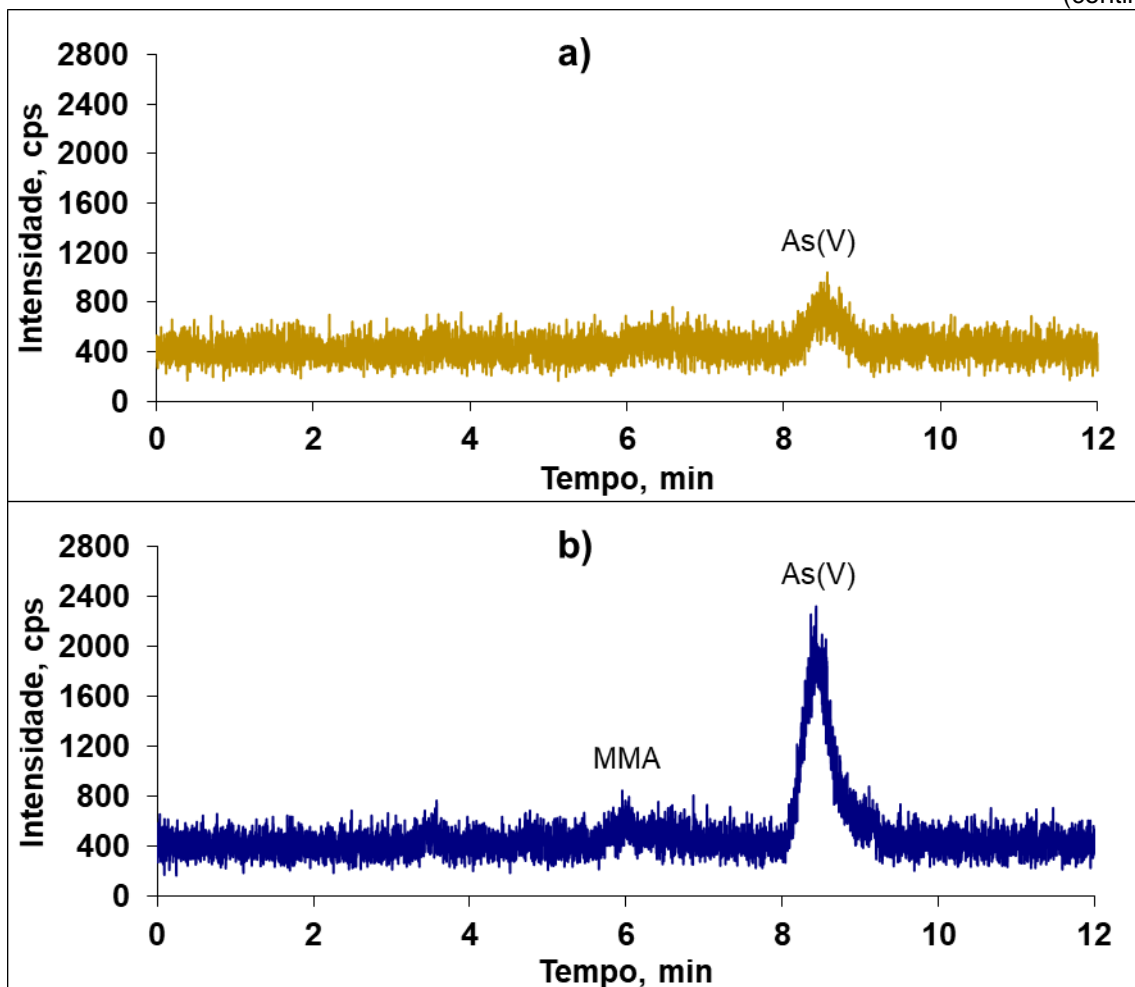
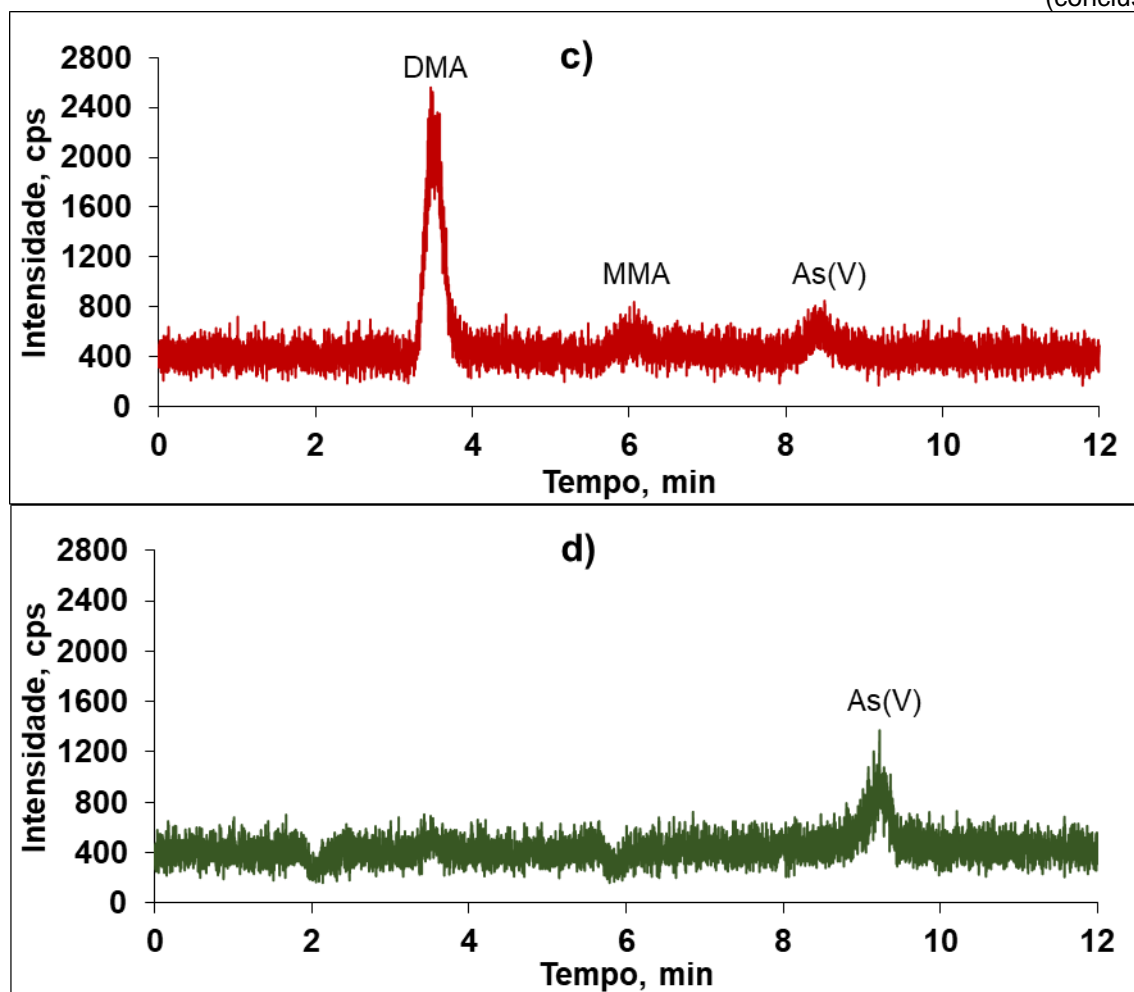


Figura 28 - Cromatogramas obtidos para: (a) cerveja de arroz; (b) leite de arroz; (c) saquê e (d) vinagre de arroz. As amostras foram diluídas 1:1 (v v-1) em fosfato de amônio 9,0 mmol L-1 (fase móvel, com pH 9,00) e submetidas à EME.

(conclusão)



Fonte: Autor.

Entretanto, acredita-se que a diminuição da espessura da membrana e a modificação da superfície de contato do eletrodo de platina podem ser promissores para futuros estudos relacionados à EME para posterior análise de especiação de As. Visto que um dos principais problemas associados à falta de reprodutibilidade podem ser imputados à passivação da superfície dos eletrodos imersos na solução, sobretudo, em função do elevado potencial que deve ser aplicado quando do emprego de uma membrana muito espessa, como a que foi utilizada no presente estudo.

5.4.5 Comparação dos resultados obtidos pelos métodos propostos para análise de especiação de As

Tendo em vista a proposição da comparação entre quatro procedimentos diferentes de preparo das amostras visando a análise de especiação de As por LC-ICP-MS em derivados líquidos de arroz, na Tabela 17 é apresentado um comparativo dos métodos de preparo propostos.

Tabela 17 – Resumo dos resultados obtidos para a análise de especiação de As por LC-ICP-MS com troca de íons, comparando os quatro métodos propostos para preparo das amostras de leites de arroz, cervejas, saquê e vinagre de arroz.

Critérios	Resultados			
	Diluição	Evaporação	Liofilização	EME
Característica geral	Preparo simples e rápido	Preparo moroso	Preparo moroso	Preparo rápido
Determinação das espécies	A partir de calibração externa com e sem ajuste de matriz	A partir de calibração externa sem ajuste de matriz	A partir de calibração externa sem ajuste de matriz	A partir de calibração submetida ao método
Eficiência	Não envolveu perdas perceptíveis	Houve perdas por evaporação e/ou adsorção das espécies e possível oxidação do As(III) a As(V)	Houve perdas por adsorção das espécies	Baixa eficiência de eletroextração e baixa reprodutibilidade
Remoção da matriz	Não remove as interferências de matriz	Não foi perceptível remoção completa das interferências da matriz	Foi perceptível remoção completa das interferências da matriz	Foi perceptível remoção completa de interferências de matriz

Fonte: Autor.

A análise de especiação de As foi possível a partir da diluição 1:2 ($v v^{-1}$) das amostras na fase móvel fosfato de amônio $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6,00, à vazão de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. O uso de calibração externa sem ajuste de matriz permitiu a análise de especiação de As nos leites de arroz, nos quais o predomínio foi de iAs e DMA, e em vinagre de arroz, no qual predominou As(V). Para as amostras alcoólicas foi necessária calibração com ajuste de matriz, sendo que nas cervejas houve predomínio de iAs e no saquê, DMA.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foram propostas quatro diferentes metodologias que visaram a análise de especiação de arsênio em dois tipos de leites de arroz, em treze tipos de cervejas, um saquê e um vinagre de arroz por LC-ICP-MS, empregando-se coluna de troca aniônica. Os estudos foram conduzidos de modo a identificar e, se possível, quantificar as espécies As(III), As(V), MMA e DMA nessas matrizes.

Para o leite de arroz, a simples diluição das amostras em fase móvel e posterior determinação por LC-ICP-MS foi suficiente para a determinação de todas as espécies investigadas. Com isso, essa proposta contornou problemas apontados em outros estudos que foram conduzidos pelo emprego de solventes orgânicos extratores, tais como o hexano.

O estudo para especiação de As em bebidas alcoólicas foi o que envolveu maior número de adversidades, uma vez que a partir desse estudo foi possível contornar uma forte interferência do etanol presente nas amostras sobre o MMA, o que inicialmente dificultou a análise de especiação de As a partir da simples diluição das amostras na fase móvel. Desse modo, a alternativa viável encontrada para especiação de As, nas amostras diluídas na fase móvel, foi o uso de calibração externa com ajuste de matriz, adicionando-se etanol às soluções de calibração em concentração similar ao existente nas amostras diluídas. Isso foi feito tanto para a cerveja, quanto para o saquê, obtendo-se resultados conclusivos nesse sentido.

A diluição da amostra para posterior análise de especiação de As também se mostrou satisfatória para o vinagre de arroz, ainda que tenha se verificado certa influência do ácido acético presente na matriz, posterior ao pico de As(V) nos cromatogramas.

A partir dos efeitos observados para o etanol e para o ácido acético, através de estudo envolvendo matrizes simuladas confirmou-se que o metanol causa interferência sobre o sinal de DMA, o etanol sobre o MMA e o ácido acético sobre o As(V). O que indica a presença de interferências não observadas em trabalhos prévios sobre análise de especiação de As em cervejas e vinagre (Huang *et al.* 2012), em que os autores atribuíram aos picos cromatográficos com etanol e com ácido acético a existência de apenas espécies de As desconhecidas.

Buscando-se contornar as interferências de matriz mencionadas, foram então propostas a evaporação, liofilização ou EME das amostras, anteriores à análise de especiação de As por LC-ICP-MS, as quais mostraram-se insatisfatórias para todas as amostras avaliadas. Entretanto, a liofilização revelou-se promissora e requer otimizações, uma vez que, as perdas de espécies foram baixas e similares para todas elas, o que reforça a hipótese de que não houve interconversão das mesmas. Além disso, a EME mostrou-se muito eficiente para a remoção da matriz, entretanto, com baixíssima recuperação das espécies. É possível que o aprimoramento do sistema em estudos futuros poderá viabilizar o método, o qual é inovador.

No que tange aos resultados obtidos na análise de especiação de As por LC-ICP-MS, após simples diluição das amostras na fase móvel, pode-se afirmar que, de modo geral, eles refletem a distribuição das espécies de As em arroz, conforme trabalhos publicados sobre o assunto. Na maioria dos derivados de arroz analisados, cerca de 50% do As está na forma inorgânica, seguido por DMA e, em concentração bem menor, geralmente inferior ao LD, o MMA. A maior concentração de As foi encontrada no leite de arroz, sendo que a concentração do elemento no leite de arroz integral era quase o dobro do que no leite de arroz comum. Ainda que a referida concentração seja relativamente baixa em relação aos limites máximos estabelecidos pelas legislações vigentes, os resultados são preocupantes, visto que tais produtos são sobremaneira voltados ao consumo pelas crianças. Com base no limite seguro de ingestão diária de As determinado pela OMS ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corporal), por exemplo, no máximo dois copos de leite de arroz integral por dia poderiam ser consumidos por uma criança que pese, aproximadamente, 15 kg.

A concentração de As na cerveja é bem inferior do que no leite de arroz, sendo que a maior concentração do elemento foi encontrada nas duas cervejas em cujos rótulos é informado que as mesmas contém arroz. A concentração máxima de As encontrada na cerveja foi $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, o que não representa necessariamente riscos de intoxicação aguda por esse elemento, sobretudo, por ser um produto voltado para adultos. Essas conclusões também se aplicam ao saquê, ainda que a concentração de As neste seja mais elevada do que nas cerveja (próximo a $13,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de As total). Além disso, no saquê observou-se que há maior predominância de DMA (acima de 85%) em relação às demais espécies, a qual é menos tóxica que iAs. No vinagre de arroz foi encontrada baixa concentração de As ($5,3 \mu\text{g L}^{-1}$), que não parece

representar riscos, tendo-se em vista que seu consumo diário é bem inferior em volume em relação aos demais produtos analisados.

Sendo assim, pode-se afirmar que os objetivos propostos foram atingidos, pois, a análise de especiação de As foi realizada para todos os grupos de amostras investigadas, mediante a simples diluição das mesmas, tornando o método mais simples, rápido e ambientalmente favorável. Além disso, foi possível propor métodos de preparo das amostras, que ainda requerem aprimoramentos, mas que possuem caráter promissor.

Com a obtenção de um método cromatográfico abrangente foi possível a determinação das espécies investigadas em praticamente todas as amostras. A única ressalva que deve ser feita refere-se a limitação instrumental do método, tendo-se em vista que após longo tempo de trabalho contínuo há perda significativa de sensibilidade para todas as espécies de As, o que requer recalibrações em intervalos de tempo mais curtos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIN, M. J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. **Uptake kinetics of arsenic species in rice plants**. *Plant Physiology*, v. 128, n. 3, p. 1120-1128, 2002.

ALTHOBITI, R. A.; SADIQ, N. W.; BEAUCHEMIN, D. **Realistic risk assessment of arsenic in rice**. *Food Chemistry*, v. 257, p. 230-236, 2018.

AMARAL, C. D.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. **Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants—a review**. *Talanta*, v. 115, p. 291-299, 2013.

AMMANN, A. A. **Arsenic speciation analysis by ion chromatography—a critical review of principles and applications**. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2, n. 01, p. 27, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos**. Resolução RDC nº 42, Brasil, 2013.

ARAO, T. *et al.* **Effects of arsenic compound amendment on arsenic speciation in rice grain**. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 4, p. 1291-1297, 2011.

ARAO, T. *et al.* **Effect of air temperature after heading of rice on the arsenic concentration of grain**. *Soil Science and Plant Nutrition*, p. 1-5, 2018.

B'HYMER, C.; CARUSO, J. A. **Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, v. 1045, n. 1-2, p. 1-13, 2004.

BABA, K. *et al.* **Arsenic speciation in rice and soil containing related compounds of chemical warfare agents**. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 15, p. 5768-5775, 2008.

BAPKAN, M. B.; PALA, A.; TÜRKMAN, A. **Arsenate removal by coagulation using iron salts and organic polymers**. *Ekoloji*, v. 19, n. 74, p. 69-76, 2010.

BATISTA, B. L. *et al.* **Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption**. *Journal Hazardous Materials*, v. 191, n. 1-3, p. 342-348, 2011.

CAMPILLO, N. *et al.* **Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection**. *Talanta*, v. 77, n. 2, p. 793-799, 2008.

CAMPOS, C. D. M. *et al.* **Preparo de amostras assistido por campo elétrico: Fundamentos, avanços, aplicações e tendências**. *Química Nova*, v. 38, p. 1093-1106, 2015.

CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. *et al.* **Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA**. *Environmental Pollution*, v. 163, p. 77-83, 2012.

CAREY, A. M. *et al.* **A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 402, n. 10, p. 3275-3286, 2012.

CAVA-MONTESINOS, P. *et al.* **Non-chromatographic speciation analysis of arsenic and antimony in milk hydride generation atomic fluorescence spectrometry.** Analytica Chimica Acta, v. 493, n. 2, p. 195-203, 2003.

CERVEIRA, C. *et al.* **Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS).** Analytical Methods, v. 7, n. 11, p. 4528-4534, 2015.

CHANEY, R. L.; GREEN, C. E.; LEHOTAY, S. J. **Inter-laboratory validation of an inexpensive streamlined method to measure inorganic arsenic in rice grain.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, p. 1-8, 2018.

CHEN, H. *et al.* **Geographical variations of cadmium and arsenic concentrations and arsenic speciation in Chinese rice.** Environmental Pollution, v. 238, p. 482-490, 2018.

CHEN, Y. *et al.* **A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions.** Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, v. 16, n. 2, p. 207-213, 2007.

CORNELIS, R. *et al.* **Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology.** 1. ed. Reino Unido, Wiley, 2004, 635 p.

CRUGNOLA, P. E. A.; S.R.L., L. A. **Method for preparing a rice milk.** European Patent Specification, v. EP 1 400 177 B1. 2003. Acesso em: 10/05/2018. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/7a/2a/75/797fd02ab9dd57/EP1400177B1.pdf>>.

CULLEN, W. R.; BENTLEY, R. **The toxicity of trimethylarsine: an urban myth.** Journal of Environmental Monitoring, v. 7, n. 1, p. 11-15, 2005.

D'AVILA, R. F. *et al.* **Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações.** Estudos Tecnológicos em Engenharia, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012.

DOUGLAS, D. J.; KERR, L. A. **Study of solids deposition on inductively coupled plasma mass spectrometry samplers and skimmers.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 3, n. 6, p. 749-752, 1988.

DREBORG, S. **Debates in allergy medicine: food intolerance does not exist.** World Allergy Organization Journal, v. 8, p. 6, 2015.

DUARTE, F. A. *et al.* **Evaluation of liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation in water from industrial treatment of shale.** Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, v. 62, n. 9, p. 978-984, 2007.

EC, Commission Regulation of European Union. **Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs**. 2015. Acesso em: 12/08/2018. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32015R1006>>.

EIBAK, L. E. E. *et al.* **Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions—fast isolation of drugs from untreated human plasma**. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 31, p. 5050-5056, 2010.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Water quality guidelines for maximum crop production**. Food and Agricultural Organization/UN. 1985. Acesso em: 18/08/2018. Disponível em: <www.fao.org/docrep/T0551E.2006/9/13>.

_____. **Codex Alimentarius Commission**. Geneva, 2014. Acesso em: 20/09/2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/238558/icode/>>.

FARINI, B. W.; BORGES, J. V. **JANDB – Desenvolvimento de uma “Cerveja” de Malte de Arroz**. PUCRS, p. 1-21, 2016.

FDA, Food and Drug Administration. **Limit for inorganic arsenic in infant rice cereal**. USFDA. 2016. Acesso em: 10/11/2018. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm493740.htm>>.

FELDMANN, J. *et al.* **Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine**. Clinical Chemistry, v. 45, n. 11, p. 1988-1997, 1999.

FERNANDEZ, E. F. *et al.* **Consensus Document: Nutritional and Metabolic Importance of Cow's Milk**. Nutricion Hospitalaria, v. 31, n. 1, p. 92-101, 2015.

FILHO, V. G. V. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. 1. ed. Edgard Blücher, 2005, 550 p.

GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation**. Bioanalysis, v. 3, n. 7, p. 787-797, 2011.

GONG, Z. *et al.* **Arsenic speciation analysis**. Talanta, v. 58, n. 1, p. 77-96, 2002.

HAMILTON. **Hamilton Company: PRP-X100**. 2018. Acesso em: 10/09/2018. Disponível em: <<https://www.hamiltoncompany.com/laboratory-products/hplc-columns/anion-exchange/prp-x100#top>>.

HEITKEMPER, D. T. *et al.* **Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 16, n. 4, p. 299-306, 2001.

HERCE-PAGLIAI, C. *et al.* **Presence and distribution of arsenical species in beers.** Food Additives & Contaminants, v. 16, n. 6, p. 267-271, 1999.

HERCE-PAGLIAI, C. *et al.* **Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine.** Food Additives & Contaminants, v. 19, n. 6, p. 542-546, 2002.

HINGSTON, F.; POSNER, A.; QUIRK, J. **Competitive adsorption of negatively charged ligands on oxide surfaces.** Discussions of the Faraday Society, v. 52, p. 334-342, 1971.

HSUEH, Y.M. *et al.* **Low serum carotene level and increased risk of ischemic heart disease related to long-term arsenic exposure.** Atherosclerosis, v. 141, n. 2, p. 249-257, 1998.

HUANG, J. H.; ILGEN, G.; FECHER, P. **Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 25, n. 6, p. 800-802, 2010.

HUANG, J. H. *et al.* **Occurrence and stability of inorganic and organic arsenic species in wines, rice wines and beers from Central European market.** Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, v. 29, n. 1, p. 85-93, 2012.

HUGHES, M. F. *et al.* **Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective.** Toxicological Sciences, v. 123, n. 2, p. 305-332, 2011.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **Summaries & evaluations: Arsenic and arsenic compounds (Group 1).** Lyon, p. 100 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7). França, 1987. Acesso em: 03/08/2018. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/arsenic.html>>.

JACKSON, B. P. *et al.* **Arsenic, organic foods, and brown rice syrup.** Environmental Health Perspectives, v. 120, n. 5, p. 623, 2012.

JAIN, C.; ALI, I. **Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques.** Water Research, v. 34, n. 17, p. 4304-4312, 2000.

JOHNSTON, C. S.; GAAS, C. A. **Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect.** Medscape General Medicine, v. 8, n. 2, p. 61, 2006.

JSSMA, Japan Sake and Soshu Makers Association; NRIB, National Research Institute of Brewing. **A Comprehensive Guide to Sake.** Japan Sake and Shochu Makers Association. Tóquio, Japão: 2011. 68 p.

KING, C. J. **Freeze-drying of foods.** 1. ed. London, UK: Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., 1971. 86 p.

KOROISHI, E. T. **Estudo do processo de liofilização:** aplicação para suco de laranja. Campinas, SP, p.156. 2005.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras:** fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 2. ed. Brasil: F. J. Krug, 2008. 340 p.

KUMARATHILAKA, P. et al. **Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) is influenced by environment and genetic factors.** Science of the Total Environment, v. 642, p. 485-496, 2018.

LARSEN, E. H.; PRITZL, G.; HANSEN, S. H. **Speciation of eight arsenic compounds in human urine by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection using antimonate for internal chromatographic standardization.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 8, n. 4, p. 557-563, 1993.

LARSEN, E. H.; STÜRUP, S. **Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 9, n. 10, p. 1099-1105, 1994.

LEWCHALERMVONG, K. et al. **Arsenic Speciation and Accumulation in Selected Organs after Oral Administration of Rice Extracts in Wistar Rats.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 66, n. 12, p. 3199-3209, 2018.

LINDEMANN, T. et al. **Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS.** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, v. 368, n. 2-3, p. 214-220, 2000.

LINDENBURG, P. W. et al. **Feasibility of electroextraction as versatile sample preconcentration for fast and sensitive analysis of urine metabolites, demonstrated on acylcarnitines.** Electrophoresis, v. 33, n. 19-20, p. 2987-95, 2012.

LIU, Q. et al. **Speciation of arsenic – A review of phenylarsenicals and related arsenic metabolites.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 104, p. 171-182, 2018.

MAJORS, R. **Electrical Potential as a Driving Force in Sample Preparation.** LCGC North America, v. 27, n. 1, p. 9, 2014.

MANTHA, M. et al. **Estimating Inorganic Arsenic Exposure from U.S. Rice and Total Water Intakes.** Environmental Health Perspectives, v. 125, n. 5, p. 057005/01-057005/10, 2017.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. **Solubilidade das substâncias orgânicas.** Química Nova, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

MARTINS, E. C. et al. **Liofilização como alternativa para conservação do leite humano.** Journal Health Science Institute, v. 29, n. 2, p. 4, 2011.

MAYER, H. *et al.* **Production of a saccharifying rice malt for brewing using different rice varieties and malting parameters.** Journal Agricultural Food Chemistry, v. 62, n. 23, p. 5369-77, 2014.

MEHARG, A. A. *et al.* **Inorganic arsenic levels in rice milk exceed EU and US drinking water standards.** Journal Environmental Monitoring, v. 10, n. 4, p. 428-31, 2008a.

MEHARG, A. A. *et al.* **Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains.** Environmental Science & Technology, v. 42, n. 4, p. 1051-1057, 2008b.

MICHALKE, B. **The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 21, n. 2, p. 142-153, 2002.

MOREIRA, C. M. *et al.* **Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS.** Food Chemistry, v. 126, n. 3, p. 1406-1411, 2011.

MUNERA-PICAZO, S.; BURLÓ, F.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. **Arsenic speciation in rice-based food for adults with celiac disease.** Food Additives & Contaminants: Part A, v. 31, n. 8, p. 1358-1366, 2014.

NARUKAWA, T. *et al.* **The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS.** Talanta, v. 77, n. 1, p. 427-432, 2008.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. **Ethanol:** PubChem Compound Database; CID=702. 2018. Acesso em: 23/08/2018. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>>.

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, p. 1593-1600, 2018.

NORTON, G. J. *et al.* **Environmental and genetic control of arsenic accumulation and speciation in rice grain: comparing a range of common cultivars grown in contaminated sites across Bangladesh, China, and India.** Environmental Science & Technology, v. 43, n. 21, p. 8381-8386, 2009.

OEDIT, A. *et al.* **Electroextraction and electromembrane extraction: Advances in hyphenation to analytical techniques.** Electrophoresis, v. 37, n. 9, p. 1170-86, 2016.

ORLANDO, R. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; RATH, S. **Electric field-assisted solid phase extraction: devices, development and application with a cationic model compound.** Chromatographia, v. 77, n. 1-2, p. 133-143, 2014.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. **Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids.** Journal of Chromatography A, v. 1109, n. 2, p. 183-190, 2006.

_____. **Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 10, p. 934-941, 2008.

PEDRON, T. *et al.* **Essential and non-essential elements in Brazilian infant food and other rice-based products frequently consumed by children and celiac population.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 49, p. 78-86, 2016.

PIZARRO, I. *et al.* **Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies.** *Analytica Chimica Acta*, v. 495, n. 1, p. 85-98, 2003a.

PIZARRO, I. *et al.* **Evaluation of stability of arsenic species in rice.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 376, n. 1, p. 102-109, 2003b.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. **Study of interferences from Na and Cl using ETV-ICP-MS.** *Atomic Spectroscopy-Norwalk Connecticut*, v. 19, p. 80-88, 1998.

RATERINK, R. J. *et al.* **Three-Phase Electroextraction: A New (Online) Sample Purification and Enrichment Method for Bioanalysis.** *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 16, p. 7762-7768, 2013.

RATTI, C. **Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review.** *Journal of Food Engineering*, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de Vinagre.** Bento Gonçalves, RS, Brasil: Embrapa Uva e Vinho. v. 1, 2001. 31 p.

RUTTENS, A. *et al.* **Arsenic speciation in food in Belgium. Part 2: Cereals and cereal products.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 118, p. 32-41, 2018.

SANZ, E.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, 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.

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*, v. 42, n. 12, p. 1695-1705, 2007.

SCHMACHTEL, S. *et al.* **New oxygen evolution anodes for metal electrowinning: MnO₂ composite electrodes.** *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 39, n. 10, p. 1835, 2009.

SCHOOFF, R. A. *et al.* **A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, n. 8, p. 839-846, 1999.

SEGURA, F. R. *et al.* **Arsenic speciation in Brazilian rice grains organically and traditionally cultivated: Is there any difference in arsenic content?** *Food Research International*, v. 89, n. Pt 1, p. 169-176, 2016.

SHABIR, G. A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis:** Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHIBATA, T. *et al.* **Risk Assessment of Arsenic in Rice Cereal and Other Dietary Sources for Infants and Toddlers in the U.S.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 4, p. 361-361, 2016.

SIEPMANN, F. B.; CANAN, C.; COLLA, E. **Processos e substratos para produção de vinagres:** uma revisão. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia*, v. 2, n. 12, p. 12-22, 2016.

SIGNES-PASTOR, A. J.; CAREY, M.; MEHARG, A. A. **Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children.** *Food Chemistry*, v. 191, p. 128-134, 2016.

SIGNES-PASTOR, A. J. *et al.* **Arsenic speciation in Japanese rice drinks and condiments.** *Journal of Environmental Monitoring*, v. 11, n. 11, p. 1930-1934, 2009.

SILVA, M. C.; ORLANDO, R. M.; FARIA, A. F. **Electrical field assisted matrix solid phase dispersion as a powerful tool to improve the extraction efficiency and clean-up of fluoroquinolones in bovine milk.** *Journal of Chromatography A*, v. 1461, p. 27-34, 2016.

SLEIMAN, M. *et al.* **Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, p. 163-172, 2010.

SOLOMONS, T. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica.** 9. ed. Brasil: LTC, 2009. 708 p.

SON, S. H. *et al.* **An alternative analytical method for determining arsenic species in rice by using ion chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry.** *Food Chemistry*, v. 270, p. 353-358, 2019.

SOUZA, J. M. *et al.* **Arsênio e arroz:** toxicidade, metabolismo e segurança alimentar. *Química Nova*, v. 38, n. 1, p. 118-127, 2015.

SPERLING, M.; KARST, U. **Advances in speciation techniques and methodology.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 104, p. 1-3, 2018.

SUN, G. X. *et al.* **Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments.** *Environment International*, v. 35, n. 3, p. 473-475, 2009.

SWEDLUND, P. J.; WEBSTER, J. G. **Adsorption and polymerisation of silicic acid on ferrihydrite, and its effect on arsenic adsorption.** *Water Research*, v. 33, n. 16, p. 3413-3422, 1999.

TAN, T. Y. *et al.* **Electroenhanced solid-phase microextraction of methamphetamine with commercial fibers.** *Journal of Chromatography A*, v. 1297, p. 12-16, 2013.

TERLECKA, E. **Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques.** *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 107, n. 1-3, p. 259-284, 2005.

VELOSO, C. L. **Sistema de produção de vinagre.** SBRT, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Brasil: 2013. 26 p.

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.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for Drinking-Water Quality.** 2. ed. v. 1, 1993. Acesso em: 15/09/2018. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq2v1/en/>.

_____. **Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds.** 2. ed. Genebra, Suíça, 2001, 501 p. Acesso em: 03/10/2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>>.

_____. **Guidelines for drinking-water quality.** 3. ed. v. 1. Recommendations. Geneva, pp. 306–308b. 2008. Acesso em: 19/09/2018. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDW12rev1and2.pdf>.

WILLIAMS, P. *et al.* **Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure.** *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 15, p. 5531-5540, 2005.

WUETHRICH, A.; HADDAD, P.; QUIRINO, J. **Electrophoretic concentration — A simple and green approach for sample preparation.** *LCGC Europe*, v. 35, p. 197-201, 2017.

WUETHRICH, A.; HADDAD, P. R.; QUIRINO, J. P. **Green sample preparation for liquid chromatography and capillary electrophoresis of anionic and cationic analytes.** *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 8, p. 4117-4123, 2015.

_____. **The electric field – An emerging driver in sample preparation.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 604-611, 2016.

YAMAGUCHI, S. K. F. *et al.* **Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão.** *Revista Espacios*, v. 38, n. 22, p. 12, 2017.

YUAN, C.-G.; JIANG, G.-B.; HE, B. **Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 20, n. 2, p. 103-110, 2005.

ZAVALA, Y. J. *et al.* **Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health.** *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 10, p. 3861-3866, 2008.

ZHANG, X. *et al.* **Study of arsenic-protein binding in serum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis.** *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 1, p. 141-147, 1998.

