

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Quantificação de As inorgânico em alimentos derivados de arroz mediante
geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica**

GREICE MAGALHÃES DOS SANTOS

Porto Alegre, agosto de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GREICE MAGALHÃES DOS SANTOS

**Quantificação de As inorgânico em alimentos derivados de arroz mediante
geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof.^a Dr.^a Dirce Pozebon
Orientadora

Porto Alegre, agosto de 2016.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 08/2015 e 06/2016, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Doutora Dirce Pozebon. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Fabrina Regia Stumm
Bentlin



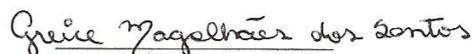
Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes



Prof.^a. Dr.^a. Tânia Mara Pizzolato



Prof.^a Dr.^a Dirce Pozebon



Greice Magalhães

dos Santos

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico; é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha querida orientadora, Profa. Dra. Dirce Pozebon, que me aceitou como sua aluna na metade de minha trajetória na pós-graduação e, com muita dedicação e paciência, auxiliou-me até o fim de mais essa etapa em minha vida acadêmica. Agradeço também ao Prof. Dr. Diogo de Pompéu Moraes e a colega Ms. Camila Cerveira pela grande ajuda com o equipamento de HG-AAS, quando tive inúmeras dúvidas e dificuldades em seu uso. Obrigada pela paciência e pela dedicação em me auxiliar na conclusão do meu trabalho.

Aos meus pais Iara Regina e Nelson Artur, bem como minha irmã Stéfanie e minha avó Maria, agradeço pelo amor incondicional, pela compreensão com meus horários complicados para estar em família (ou até a falta deles...) e por sempre estarem dispostos a me ajudar quando deles precisei. Dedico esse trabalho a eles, que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava mais... Amo muito vocês, infinitamente!

À minha querida bolsista, Jéssica Fraga, agradeço não só pelo excelente trabalho e pela ajuda para que eu pudesse concluir meu estudo, mas também e, principalmente, pela grande amizade e companheirismo que nela encontrei. Muito obrigada por tudo! À minha colega de grupo de pesquisa e grande amiga desde o primeiro semestre de graduação, Camila Martins, agradeço pela companhia e pela ajuda com meu trabalho. Para sempre minha dupla! Ao colega Guilherme Scheffler, apesar de pouco tempo juntos no laboratório, agradeço pela ajuda e pelos artigos que me passou para ajudar na revisão bibliográfica.

Aos meus queridos amigos de jornada acadêmica e do meu antigo grupo de pesquisa, Janine Viscardi, Kácris Matos e Gustavo Bolzan, agradeço não só pela ajuda com o meu antigo trabalho como pela grande amizade que nasceu entre nós. Vocês sempre tornaram meus dias muito mais alegres; adoro vocês, “mis” amores! Aos queridos amigos que a graduação me trouxe, Cássia Ribeiro, Allan dos Santos Polidoro e Hermann Gehlen, agradeço pela amizade e pelo companheirismo, por sempre estarem presente na minha vida.

Ao meu namorado e amigo, Matthaus, agradeço pelo amor, companheirismo e felicidade que trouxe para minha vida. Te amo!

Um forte agradecimento a todos que, de alguma forma, tornaram possível o encerramento de mais essa etapa de minha vida acadêmica. À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. ARROZ E SEUS DERIVADOS	17
2.1.1. Arroz.....	17
2.1.2. Produtos à base de arroz	18
2.2. CONTAMINANTES INORGÂNICOS	21
2.2.1. Arsênio	21
2.2.1.1 Histórico	21
2.2.1.2 Características e ocorrência	22
2.2.1.3 Toxicidade do As.....	24
2.3. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS POR As.....	27
2.3.1 Contaminação do arroz e seus derivados	28
2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA	30
2.4.1. Preparo de amostras para especiação química	32
2.4.2. Métodos de extração das espécies de As.....	33
2.4.3. Separação, quantificação e detecção das espécies de As	34
2.5. TÉCNICA DE GERAÇÃO DE HIDRETOS (HG)	35
2.5.1. Análise de especiação química de As mediante geração de hidretos	37
3. OBJETIVO	41
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	43
4.2. MATERIAIS E REAGENTES	44
4.2.1 Limpeza do material utilizado.....	45
4.3. AMOSTRAS E PREPARO	46
4.3.1 As Total.....	47
4.3.2 Procedimento utilizado para especiação química de As	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	50
5.1.1 Efeito da adição de ar no separador gás-líquido	50
5.1.2 Efeito do gás de arraste, da alça de reação e da vazão dos reagentes	52
5.1.3 Influência das concentrações de HCl e NaBH₄	54
5.2 CONDIÇÕES PARA A REDUÇÃO DO As INORGÂNICO	57
5.3 SENSIBILIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO	59
5.3.1 Parâmetros de mérito	59
5.3.2 Validação da exatidão do método	61
5.4 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL	65
5.5 DETERMINAÇÃO DE As INORGÂNICO	68
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A planta de arroz absorve As, à medida que as raízes absorvem Si, presente na água e no solo, pelo mesmo mecanismo de transporte. As setas indicam o caminho que o As percorre do solo até a água da superfície, depois indo para o panículo e, por fim, para os grãos de arroz. Adaptado de Bhadha *et al.*⁵³ 29

Figura 2. Esquema do sistema empregado para a geração de hidretos e posterior detecção do As mediante a técnica de AAS. O carreador utilizado foi o HCl (4 mL min⁻¹) e o agente redutor foi o NaBH₄ (4 mL min⁻¹); alça de amostragem: 250 µL; vazão de argônio: 50 mL min⁻¹ e vazão de ar introduzido no separador gás-líquido: 1,65 mL min⁻¹ 44

Figura 3. Influência da adição de ar no separador gás-líquido na absorbância do As para 10 µg L⁻¹ de As (V). Como carreador da solução de As foi utilizado HCl 6 mol L⁻¹ 51

Figura 4. Influência da adição de ar no separador gás-líquido na absorbância do As (III), na concentração de 10 µg L⁻¹. O carreador da solução de As (III) foi o HCl 10 mol L⁻¹. 52

Figura 5. Efeito observado para a vazão do gás de arraste na absorbância integrada do As(III) na concentração de 25 µg L⁻¹. Condições utilizadas: NaBH₄ 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L⁻¹. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações. Adaptado de Cerveira.⁹⁰ 53

Figura 6. Efeito da vazão do NaBH₄ e do HCl na absorbância integrada do As(III) na concentração de 25 µg L⁻¹. Condições utilizadas: NaBH₄ 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L⁻¹. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações. Adaptado de Cerveira⁹⁰ 54

Figura 7. Influência da concentração do NaBH₄ nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie. O carreador utilizado foi o HCl 6 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira.⁹⁰ 55

Figura 8. Influência das concentrações de HCl (a) e de NaBH₄ (b) nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie. Condições utilizadas: (a) NaBH₄ 0,1% (m/v); (b) HCl 10 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira.⁹⁰ 56

Figura 9. Influência da concentração de NaBH₄ nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie, submetidas à etapa de pré-redução com KI (5% m/v) e ácido ascórbico (1% m/v) em HCl 1,2 mol L⁻¹. Condições utilizadas: HCl 10 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira⁹⁰ 58

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Compostos de As investigados em estudos sobre especiação do elemento. Adaptado de Barra et al. ³⁸	23
Tabela II: Limites máximos de As em alimentos, definidos pela ANVISA. ^{51,52}	28
Tabela III: Número de publicações envolvendo especiação de As em alimentos, com destaque para o arroz e seus derivados. Adaptado de Lynch <i>et al.</i> ⁶⁷	32
Tabela IV. Relação das amostras de alimentos sólidos à base de arroz analisadas.	46
Tabela V. Relação das amostras líquidas dos produtos à base de arroz analisadas e respectivos fatores de diluição das análises efetuadas.	47
Tabela VI. Condições do método de determinação de As total, As(III) e As inorgânico em alimentos derivados de arroz, por HG-AAS.	59
Tabela VII. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumental e do método para as amostras sólidas e parâmetros da curva de calibração.	60
Tabela VIII. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para as amostras líquidas. O LD e o LQ instrumental são citados na Tabela VII.	60
Tabela IX. Recuperação do As total adicionado às amostras sólidas de alimentos à base de arroz, de forma a obter $2 \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento no extrato. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações ($n=3$).	61
Tabela X. Recuperação do As(III) adicionado às amostras sólidas de alimentos à base de arroz, de forma a obter $4 \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento no extrato	62
Tabela XI. Recuperação do As(V) adicionado às amostras sólidas à base de arroz, de forma a obter $4 \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento no extrato	63
Tabela XII. Resultados da análise dos materiais de referência de farinhas de arroz. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$).	63
Tabela XIII. Recuperação do As total adicionado às amostras líquidas à base de arroz.	64
Tabela XIV. Recuperação do As(III) adicionado às amostras líquidas à base de arroz, de forma a obter $1 \mu\text{g L}^{-1}$ da espécie na amostra diluída.	65
Tabela XV. Concentração de As total encontrada nas amostras de alimentos à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$).	66

Tabela XVI. Concentrações para As total encontrada nas amostras líquidas à base de arroz analisadas por ICP-MS e HG-AAS. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3). 67

Tabela XVII. Concentração de As inorgânico, As(III), As(V) e As total, encontrada nas amostras sólidas de alimentos à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3). 70

Tabela XVIII. Concentração de As(III) encontrada nas amostras líquidas à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3). 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS: Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês, “*Atomic Absorption Spectrometry*”.

AES: Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês, “*Atomic Emission Spectrometry*”.

AFS: Espectrometria de Fluorescência Atômica, do inglês, “*Atomic Fluorescence Spectrometry*”.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

As(III): arsenito.

As(V): arsenato.

As: arsênio.

AsB: arsenobetaína.

AsC: arsenocolina.

CRM: material de referência certificado; do inglês, “*Certified Reference Material*”.

DMA(III): ácido dimetilarsenioso.

DMA(V): ácido dimetilarsínico.

FAO: Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, do inglês, “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”.

FD: fator de diluição.

FDA: Administração de Comidas e Remédios; do inglês, “*Food and Drug Administration*”.

HG: geração de hidretos; do inglês, “*Hydride Generation*”.

HG-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês, “*Hydride Generation -Atomic Absorption Spectrometry*”.

HPLC: Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência; do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”.

HPLC-ICP-MS: Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado; do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”.

IARC: Agência Internacional de Pesquisas em Câncer; do inglês, “*International Agency for Research on Cancer*”.

ICP-MS: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado; do inglês, “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”.

IRMM: do inglês, *Institute for Reference Materials and Measurements*.

IUPAC: do inglês, “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”.

LD: Limite de detecção.

LQ: Limite de quantificação.

m/v: massa por volume.

MMA(III): ácido monometilarsenioso.

MMA(V): ácido monometilarsônico.

NIST: do inglês, “*National Institute of Standards and Technology*”.

rpm: rotações por minuto.

RSD: desvio padrão relativo: do inglês, “*Relative Standard Deviation*”.

SPE: extração em fase sólida: do inglês, “*Solid Phase Extraction*”.

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria.

v/v: volume por volume.

WHO: Organização Mundial da Saúde; do inglês, “*World Health Organization*”.

RESUMO

No presente estudo, desenvolveu-se um método de análise de especiação de As inorgânico em alimentos derivados de arroz, mediante a técnica de geração de hidretos (HG) associada à espectrometria de absorção atômica (AAS). As condições para a geração seletiva dos hidretos de As(III) e As inorgânico, e As total foram HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v), HCl 6 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,5% (m/v), respectivamente. Vinte amostras de alimentos à base de arroz comercializadas no Rio Grande do Sul foram analisadas, incluindo bolacha, massa, leite em pó, farinha, mistura para bolo e arroz para sushi; também foram analisadas amostras líquidas tais como vinagre, cerveja, vinho e bebidas lácteas. Nessas amostras, o As total foi quantificado após extração alcalina com K₂S₂O₈ 2% (m/v) e HNO₃ 10% (v/v) sob aquecimento em banho-maria a 90 °C, seguido da determinação do As por HG-AAS. O limite de detecção do As total foi 6,8 ng g⁻¹. As espécies de As nas amostras sólidas foram extraídas utilizando-se HNO₃ 0,28 mol L⁻¹ e aquecimento em banho-maria a 95 °C, sendo que, nessas condições, não ocorre a interconversão das espécies. Para a quantificação do As inorgânico, foi necessária a pré redução do As, com o emprego de solução de KI/ácido ascórbico, em meio ácido. Os limites de detecção do As(III) e As inorgânico foram 5 ng g⁻¹ e 11 ng g⁻¹, respectivamente. As concentrações de As(III) e As inorgânico nas amostras analisadas variaram, respectivamente, de 9,5 ± 0,6 a 71,8 ± 6,1 ng g⁻¹ e 23,7 ± 6,9 a 82,9 ± 4,7 ng g⁻¹. A concentração de As(V) foi obtida por diferença. A concentração de As total variou de 20,3 a 124 ng g⁻¹. As amostras líquidas, para determinação do As total e do As (III) presente, foram simplesmente diluídas com HNO₃ 0,28 mol L⁻¹, uma vez que testes preliminares mostraram melhor exatidão mediante diluição das amostras, ao invés da extração com K₂S₂O₈ 2% (m/v) e HNO₃ 10% (v/v). Os limites de detecção do As total variaram de 0,34 a 1,70 µg L⁻¹, enquanto que os do As(III) variaram de 0,50 a 2,50 µg L⁻¹. Com o intuito de se avaliar a exatidão do método foram realizados testes de recuperação do analito. Foi também analisada farinha de arroz certificada, sendo as concentrações de As total e As inorgânico concordantes com os valores de referência.

Palavras-chave: especiação química, As inorgânico, produtos derivados do arroz, HG-AAS.

ABSTRACT

The present study is about chemical speciation analysis of inorganic As (iAs) in rice products using hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS). Selective generation of arsine of As(III) is achieved with 0.1% (m/v) NaBH₄ and 10 mol L⁻¹ HCl. Inorganic arsenic (iAs) is pre reduced and determined in the same conditions used for As(III). Samples of rice products such as flour, cookies, cracker, pasta, milk powder, cakes, rice for sushi, dairy beverage, vinegar, wine and beer were analyzed. Total arsenic (tAs) in solid samples was extracted with 2% (m/v) K₂S₂O₈ and 10% (m/v) HNO₃ and heating in water bath at 90 °C for 3 h, while arsenic species were extracted with 0.28 mol L⁻¹ HNO₃ and heating in water bath at 95 °C for 1.5 h. The limits of detection (LODs) of the method for As(III), iAs and tAs were 5 ng g⁻¹, 11 ng g⁻¹, and 6.8 ng g⁻¹ respectively. Concentrations of As(III), iAs, and tAs in the solid samples ranged from 16.5 ± 7.2 to 71.8 ± 6.1 ng g⁻¹, 26.7 ± 0.3 to 82.9 ± 4.7 ng g⁻¹, and 35.8 ± 0.4 to 136 ± 2 ng g⁻¹, respectively. Liquid samples were simply diluted in 0.28 mol L⁻¹ HNO₃. Arsenic (III) and tAs were determined in these samples. The LODs of As(III) and t(As) were in the range of 0.28 to 0.85 µg L⁻¹ and 0.5 to 2.5 µg L⁻¹, depending on the sample dilution. The concentration of As(III) in liquid samples was up to 11.4 ± 0.4 5 µg L⁻¹ while that of tAs ranged from 1.35 ± 0.12 to 24.6 ± 0.5 µg L⁻¹.

Keywords: chemical speciation, inorganic As, products derived from rice, HG-AAS.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A análise de especiação química compreende a determinação da concentração das diferentes formas químicas de um elemento em uma dada matriz. Atualmente, sabe-se que apenas a concentração total é uma informação limitada a respeito de um elemento, principalmente sobre o seu comportamento no meio ambiente, bem como dos danos que pode provocar à saúde humana.^[1] A *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, define espécie química como a “forma específica de um elemento quanto a sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou estrutura molecular”.^[2]

Uma vez que as propriedades físicas, químicas e biológicas dependem da forma química em que o elemento se encontra presente na amostra analisada, determinar a concentração total de elementos como o arsênio (As), por exemplo, não indica os verdadeiros níveis de cada espécie individualmente. Para estimar o real risco envolvido, precisam ser considerados fatores como a variação da toxicidade, do transporte e da biodisponibilidade, que são dependentes da forma química na qual o arsênio encontra-se presente.^[1,3]

Entre as espécies de As, as inorgânicas (As(III) e As(V)) são consideradas em torno de 100 vezes mais tóxicas, quando comparadas com as formas metiladas do elemento,^[3] justificando-se, dessa forma, o estudo e o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificar essas espécies. Neste contexto, a especiação química de arsênio tem despertado cada vez mais o interesse de diversos grupos de pesquisa, sendo que diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para a determinação de As inorgânico, orgânico e total em diversas matrizes, tais como água e alimentos de origem marinha e vegetal.

Porquanto o arroz é um dos alimentos mais populares mundialmente, faz-se necessária a obtenção de maiores informações sobre a forma que o As ocorre no grão, que, por sua vez, já é sabido possuir grande capacidade em absorver esse elemento. Além disso, existe a necessidade de se estabelecer valores de referência de acordo com as diferentes toxicidades de cada espécie de As, conferindo segurança à população em relação ao consumo de arroz.^[3]

^{6]} Dessa forma, em comparação a outros alimentos à base de farinha de trigo e outros cereais, os produtos à base de arroz, como farinha, bolachas, massas e bebidas, entre outros, possuem concentrações mais elevadas de As em sua composição. Tais alimentos são muito utilizados em dietas de pessoas com restrição total ao glúten, denominados “celíacos”, uma vez que o arroz substitui o trigo como cereal, proporcionando uma alimentação saudável. Todavia, inúmeros estudos vêm alertando sobre a presença de As inorgânico, a forma mais tóxica e

prejudicial do elemento, tanto no arroz, quanto em seus derivados, representando um risco iminente para a saúde humana, principalmente para aqueles que dependem diariamente desses alimentos.^{[4],[7-12]}

Técnicas cromatográficas para a análise de especiação química de As geralmente envolvem equipamentos de custo elevado e são de operação mais complicada. Alternativamente, há o uso da técnica de geração de hidretos (HG) associada com técnicas de espectrometria atômica, como a fluorescência atômica (AFS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ou a absorção atômica (AAS). A técnica de geração de hidretos associada a espectrometria de absorção atômica (HG-AAS) tem boa sensibilidade para a determinação de As, assim como possibilita a quantificação individual de espécies inorgânicas de As, já que apresentam diferente reatividade e sensibilidade frente ao agente redutor (NaBH_4). Dentre as diversas vantagens da HG-AAS destacam-se seu baixo custo e a maior simplicidade de operação, sendo utilizados equipamentos disponíveis na maioria dos laboratórios.

Por conseguinte, há uma crescente necessidade de se desenvolver métodos de análise de especiação química de As inorgânico em alimentos à base de arroz, devido sua maior toxicidade. Neste contexto, estudos anteriores já demonstraram que a HG-AAS pode ser eficientemente utilizada na análise de especiação química de As inorgânico em arroz. Dessa forma, mediante modificações da metodologia desenvolvida para análise de arroz, propõe-se neste estudo a análise de especiação química de As inorgânico em alimentos derivados de arroz, mediante a HG-AAS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ARROZ E SEUS DERIVADOS

2.1.1. Arroz

Originário do continente asiático, o arroz (*Oryza sativa* L.) configura-se atualmente como um dos cereais mais produzidos e consumidos mundialmente, sendo considerado um dos principais alimentos para a grande maioria da população, desempenhando um relevante papel nos aspectos econômico e social.^[13] Em comparação com outros cereais, o arroz apresenta grande valor nutricional e baixo custo, o que enfatiza a importância de ser cultivado mundialmente.^[14] Países como China, Indonésia, Myanmar, Vietnã, Tailândia e Bangladesh destacam-se entre os grandes produtores mundiais.

O arroz faz-se presente na alimentação diária de mais de 50% da população mundial, caracterizando-se como uma das mais relevantes culturas, seguida pelo milho e trigo. No Brasil, maior produtor de arroz fora do continente asiático, o consumo supera a marca de 50 kg de arroz/habitante/ano, fazendo parte da cesta básica do brasileiro. A produção agrícola supera os 13 milhões de toneladas anuais de arroz, sendo os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina responsáveis por mais de 80% do total da produção nacional. Vale destacar que esse total considera o arroz cultivado em terras altas (sem solo inundado) e o arroz cultivado em solo irrigado.^[15]

No que diz respeito à sua composição química, o arroz apresenta-se como uma matriz complexa, composta por carboidratos, proteínas, fibras e sais minerais, ferro, cálcio e fósforo, além de outros componentes, essenciais para a nutrição humana.^[16] Pertencente ao grupo das monocotiledôneas, da família das *Poaceae* (gramíneas), o grão de arroz *in natura* é formado pela casca, farelo e endosperma. O farelo é considerado a parte mais nutritiva, uma vez que contém o gérmen do grão, que possui grande quantidade de proteínas e lipídeos; todavia, representa apenas 2% em massa do grão de arroz. Em contrapartida, a casca do arroz contribui para 20% da massa do grão, sendo composta de duas folhas modificadas (pálea e lema), retiradas antes do consumo do grão. Por fim, o endosperma corresponde à maior porção do grão, sendo rico em amido, porém deficiente em proteínas.^[17]

Os grãos de arroz passam por diversos processos de beneficiamento após sua colheita, sendo esses responsáveis pelos diferentes tipos do produto presentes no mercado. Os mais comuns são o arroz integral, obtido após a remoção da casca; o arroz parboilizado, para o qual o grão é submetido, ainda com casca, a um processo hidrotérmico; e o arroz polido, no qual

após a remoção da casca, o cereal também passa por uma etapa de remoção do farelo, denominado polimento do grão.^{[15],[17]} Em termos de consumo, observa-se que a preferência no Brasil é pelo arroz polido, seguido do parboilizado e do integral.

Duas características são avaliadas a fim de classificar os grãos de arroz: o tamanho dos grãos, que corresponde à classe, e a qualidade dos grãos, correspondente ao tipo. A classificação segundo a classe baseia-se no tamanho do grão, compreendendo o arroz curto, médio, longo, fino (agulhinha) e misturado. Já a classificação de acordo com o tipo é fundamentada na proporção de grãos inteiros para grãos defeituosos, seguindo uma escala de 1 a 5, representando o número 1 o arroz de melhor qualidade.^[18]

O cultivo de arroz livre de produtos químicos, tais como fertilizantes, agrotóxicos, pesticidas e sementes modificadas geneticamente, conhecido como arroz orgânico, vem se tornando cada vez mais atrativo e rentável, em decorrência do crescente aumento na demanda por alimentos saudáveis, bem como pelos denominados ecologicamente corretos. Neste contexto, há também o arroz biodinâmico, o qual segue os mesmos princípios do plantio do arroz orgânico; contudo, o adubo empregado é a base de ervas medicinais, sílica e esterco, sendo adicionados aos poucos ao solo, buscando sempre manter o equilíbrio entre o sistema solo-planta-animal.^[19] Com o intuito de comprovar que o produto segue estes tipos de cultivo, o arroz biodinâmico necessita de certificação, a fim de garantir a forma de cultivo.^[20]

2.1.2. Produtos à base de arroz

Uma vez que o arroz possui grande capacidade de absorver As em sua estrutura, produtos alimentícios derivados deste cereal acabam, por sua vez, também contendo quantidades apreciáveis desse elemento em sua composição.^[21] Dessa forma, para populações que possuem a sua alimentação baseada em arroz e seus derivados, uma vez que são produtos de elevado poder nutritivo, a contaminação por As inorgânico é em grande parte devido a esses alimentos. Outro fator relevante para a contaminação humana é a água utilizada para consumo, proveniente de mananciais e solos contaminados por As, principalmente no sudeste asiático, na China e nos EUA.^{[1],[22-24]}

Segundo Signes-Pastor *et al.*,^[10] há uma grande preocupação no que diz respeito à contaminação por As inorgânico por bebês e crianças, uma vez que comidas especiais à base de arroz (“papinhas”) para bebês, bolachas e cereais de arroz são muito presentes na sua alimentação. Os autores ainda destacam que produtos à base de arroz são também largamente

utilizados para alimentar os jovens, uma vez que são alimentos de elevado valor nutritivo, com potencial alergênico relativamente baixo, sabor leve e agradável e bastante disponíveis no mercado.

Munera-Picazo *et al.*^[12] afirmam que o consumo desses derivados de arroz é maior por parte de crianças e adultos que sofrem de doença celíaca, que consiste em uma grave reação alérgica causada pela ingestão de glúten, principal proteína do trigo, centeio, aveia, cevada e malte. Sendo assim, os celíacos, como são denominados os indivíduos intolerantes ao glúten, necessitam recorrer a um tipo de alimentação que seja totalmente isenta dessa proteína, encontrando no arroz e seus derivados, uma forma de nutrição segura e saudável. Os autores ainda salientam que os familiares de pacientes celíacos também seguem uma dieta livre de glúten, a fim de evitar uma possível contaminação cruzada, optando, dessa forma, por alimentos à base de arroz em sua alimentação. Logo, tais indivíduos tornam-se mais vulneráveis a ingestão de maiores quantidades de As, quando comparados a uma família que não possua um membro afetado por esse distúrbio metabólico.

Estudos recentes evidenciam a presença de As inorgânico em outros produtos à base de arroz, tais como bolacha, leite, vinho, vinagre, cereais matinais e barras de cereal, sugerindo assim que todos os alimentos que possuem arroz em sua composição podem vir a ser uma fonte adicional de exposição ao As inorgânico.^{[11],[21],[25]} O leite de arroz, produzido comercialmente a partir da liquefação do grão inteiro, com a adição da enzima alfa-amilase, em meio aquoso, e no âmbito doméstico, mediante a extração do arroz moído com água quente, é uma alternativa ao leite de vaca, similar ao leite de soja, muito empregado em dietas de indivíduos veganos/vegetarianos, intolerantes à lactose e aqueles que evitam consumir hormônios presentes no leite animal.

Meharg *et al.*^[25] realizaram um estudo em 2007, no Reino Unido, onde adquiriram 19 amostras de leites de arroz produzidos no mercado local, juntamente a 16 amostras de arroz (8 do tipo integral e 8 do tipo branco polido), para preparar leite de arroz utilizando uma máquina especializada para esse fim. Nas amostras comerciais, os níveis de As total variaram de 10,2 a 33,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que todos eles mostraram-se acima do valor máximo permitido para água potável utilizada para consumo humano no Reino Unido, que é de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os autores justificam a comparação do leite de arroz com a água uma vez que este é muito utilizado nessa região como uma bebida substituinte da água. O As inorgânico mostrou-se como a forma predominante de As nas bebidas comerciais, com níveis variando de 7,1 a 20,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que em 12 amostras a concentração de As inorgânico excedeu o máximo

tolerável para As total ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Para o leite de arroz produzido em máquina comercial, os autores reportam que 75% das amostras de arroz branco polido originaram leite de baixa qualidade, muito viscoso, sendo similar a um gel. Dessa forma, foi possível determinar somente o As total, que ficou entre $1,5$ a $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Em contrapartida, as amostras de arroz integral originaram leite de ótima qualidade, com baixa viscosidade, possibilitando a especiação do As; os níveis verificados para As total foram de $2,7$ a $14,1 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que para o As inorgânico foram de $1,7$ a $4,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

Em outro estudo, análises realizadas em amostras de urina, provenientes da população japonesa não exposta ocupacionalmente ao As, revelaram uma média de $173 \mu\text{g L}^{-1}$ de As total, valor extremamente elevado quando comparado com populações da Europa e/ou do Reino Unido, onde as concentrações médias de As foram $8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $65,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Segundo Signes-Pastor *et al.*,^[26] uma explicação plausível seria o elevado consumo de arroz e produtos à base de arroz pelos japoneses e, tendo em vista a escassez de dados com respeito ao As em bebidas e condimentos derivados desse cereal, os autores realizaram um estudo de especiação de As em *amazake* (vinho doce fermentado de arroz), *missô* (pasta feita a partir da fermentação do arroz, com cevada, soja e sal) e xaropes. Foram encontradas as seguintes concentrações médias: para As total, $0,14 \pm 0,006 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de *missô*, $0,33 \pm 0,006 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de xarope, $0,12 \pm 0,006 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de *amazake*; para As inorgânico, $0,110 \pm 0,009 \mu\text{g kg}^{-1}$ no *missô*, $0,234 \pm 0,006 \mu\text{g kg}^{-1}$ no xarope e $0,103 \pm 0,014 \mu\text{g kg}^{-1}$ no *amazake*. Os autores ainda determinaram As total nos mesmos alimentos, mas à base de trigo e milho, encontrando, aproximadamente, a metade da concentração quando comparados aos mesmos derivados de arroz. Logo, os autores concluíram que esses três tipos de alimentos à base de arroz, muito consumidos pela população japonesa, podem conter concentrações significativas de As inorgânico e que, consumir esse tipo de produto derivado de outros alimentos com menor teor de As, como o trigo e o milho, pode vir a ser uma alternativa para diminuir a ingestão desse elemento.

Também visando quantificar e confirmar que produtos à base de arroz representam fontes adicionais de exposição ao As em alimentos, Sun *et al.*^[21] analisaram um total de 40 amostras de bolacha, massa, barras de cereal, *amazake*, óleo, vinagre, entre outros. As maiores concentrações de As total foram encontradas nas amostras de bolacha, barras de cereal e massas à base de arroz e, sendo assim, essas foram as amostras selecionadas para a análise de especiação química de As. Em todas essas amostras, segundo os autores, as espécies inorgânicas de As foram as predominantes, correspondendo a 75,2 a 90,1% do teor

total de As. Os autores, assim como outros já citados anteriormente, destacam o fato de crianças serem grandes consumidoras de alimentos derivados de arroz, como bolachas e cereais e que, dessa forma, são muito suscetíveis à exposição ao As.

Por conseguinte, percebe-se a evidente necessidade da realização de mais estudos de especificação de As em produtos derivados de arroz, consumidos em diversas partes do mundo, uma vez que as pesquisas têm mostrado que esses alimentos representam uma fonte adicional desse elemento na alimentação de adultos e, principalmente, bebês, crianças e celíacos, que deve ser considerado relevante no que tange os malefícios e as doenças que a intoxicação por As inorgânico pode acarretar ao organismo humano.

2.2. CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Existem metais e metaloides que são ditos essenciais para os organismos vivos, chamados de micronutrientes, dentro dos quais citam-se o Co, Cu, Cr, Mn e Zn. Dessa forma, a ausência desses é maléfica, todavia, o excesso também pode vir a ser prejudicial. Já elementos como Cd, As, Ni, Pb, Sn e Sb não são encontrados naturalmente nos organismos vivos e ainda não se sabe se os mesmos desempenham alguma atividade funcional ou bioquímica. Sendo assim, em qualquer concentração são considerados prejudiciais à saúde humana, podendo acarretar altos níveis de toxicidade.^[27]

Na cultura do arroz, devido ao fato de se fazer uso da irrigação, plantas e solo são submetidos a condições anaeróbicas, que juntamente com excesso de água, ocasionam uma maior mobilidade de elementos químicos e suas respectivas espécies no meio, podendo ocorrer o acúmulo destes na planta e nos grãos. Dessa forma, o arroz pode vir a ser contaminado por esses elementos e suas espécies, provenientes de solos contaminados e água contaminada (seja ela subterrânea ou usada na irrigação), ou de pesticidas e fertilizantes utilizados no cultivo de arroz.^[4]

2.2.1. Arsênio

2.2.1.1 Histórico

No período entre a Idade Média e meados do século XIX, o As mostrou-se como um elemento de grande popularidade, envolvendo envenenamentos, homicídios e suicídios. Isto decorreu da facilidade de misturar tal elemento com alimentos ou bebidas sem que o mesmo

fosse notado, devido ao seu aspecto inofensivo e seu sabor levemente adocicado.^{[28],[29]} Um dos casos mais conhecidos de suposto envenenamento por As é a morte do imperador francês Napoleão Bonaparte, associada a um medicamento à base de As e Se que o mesmo ingeria para tratar dores estomacais. A autópsia realizada, datada de 1821, revelou a presença de câncer em seu estômago, sendo essa a provável causa de seu óbito.^[30]

Entre o final do século XIX e meados do século XX, o As passou a ser empregado como agente terapêutico, sendo compostos arsenicais utilizados, com ou sem conhecimento científico, para o tratamento de dermatoses (psoríase, eczemas, acne, entre outras), leishmaniose, prurigo e sífilis. Também era comum prescrever compostos desse elemento como tônicos e fortificantes, remédio contra “problemas no estômago” e crises nervosas, bem como no tratamento de malária, epilepsia e asma, entre outras doenças.^[28]

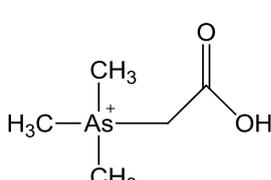
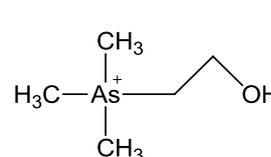
Atualmente, o maior interesse da comunidade científica a respeito do As deve-se a sua grande contribuição para a poluição ambiental, seja proveniente de fontes antropogênicas ou geológicas, devido à alta toxicidade do elemento.^[23] Contudo, medicamentos à base de As vêm sendo utilizados no tratamento de leucemia.^[31-33]

2.2.1.2 Características e ocorrência

O As é atualmente classificado como um metalóide, tendo em vista que apresenta propriedades físicas e químicas, tanto de um metal quanto de um não metal, sendo encontrado também na forma livre; todavia, é mais comum apresentar-se na forma de mineral. Esse elemento é classificado como sendo frágil e que apresenta três formas alotrópicas, amarelo, preto e cinza, respectivamente. O As pertence ao grupo 15 da tabela periódica dos elementos químicos, juntamente com nitrogênio, fósforo, antimônio e bismuto. Apresenta-se em variados estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5), podendo estar tanto na forma orgânica como na inorgânica. O trióxido de As (As_2O_3) é a forma comercial mais comumente encontrada, enquanto o pentóxido de As (As_2O_5) é utilizado na fabricação de inseticidas.^[1]

A maioria dos compostos arsenicais são óxidos, contendo enxofre ou outros metais, tais como: arsenolita (As_2O_3), *realgar* (As_2S_2), *orpiment* (As_2S_3), arsenopirita ($FeAs_2$), cobaltita ($CoAsS$), *gersdorffite* ($NiAsS$) e piritas arsenicais ($FeAsS$).^[34] Os compostos de As podem ser divididos em três grupos: compostos inorgânicos, como o arsenito (As(III)) e o arsenato (As(V)); compostos orgânicos, como o ácido monometilarsônico (MMA), o ácido dimetilarsínico (DMA), a arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC) e, por fim, o gás arsina (AsH_3).^[35-37] A estrutura dos composto de As supracitados encontra-se na Tabela I.

Tabela I: Compostos de As investigados em estudos sobre especiação do elemento. Adaptado de Barra *et al.*^[38]

<u>Composto</u>	<u>Fórmula</u>
Arsina	AsH ₃
Ácido arsenioso As(III)	O=As—OH
Ácido arsênico As(V)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Ácido monometilarsônico MMA (V)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ácido dimetilarsínico DMA (V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Arsenobetaina AsB	
Arsenocolina AsC	

Classificado como o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre, o As pode ser encontrado no solo, na água ou nos vegetais. Pode vir a ser concentrado em organismos marinhos e depositado em volumes apreciáveis em rochas sedimentares, ou ainda desprendido como gás volátil (arsina), sob a influência de fungos arsenófilos ou agentes redutores presentes em águas que contenham As.^[28] Um exemplo relacionado a fontes naturais é a erosão de rochas ou minerais, sendo que existem cerca de 200 minerais que possuem As em

sua composição. Aproximadamente 60% do As desprendido no meio ambiente é de origem natural, especialmente devido à atividade de vulcões.^{[37],[39]}

O meio industrial mostrou-se como uma relevante fonte de As, sendo seus compostos empregados na fabricação de produtos agrícolas (herbicidas, pesticidas, inseticidas, entre outros), na preservação de madeira e na composição de tintas, esmaltes, tecidos e couro.^[28] Atualmente, a indústria farmacêutica utiliza compostos de As, mas o elemento também está envolvido na manufatura de semicondutores e vidros. Compostos de As também são empregados na mistura de rações para aves e suínos.^{[37],[39],[40]}

Os íons ou compostos de As são solúveis em água, podendo ser absorvidos pelo organismo humano. O consumo de alimentos e de água contaminados com As é considerado a principal fonte de exposição humana a esse elemento, podendo atingir de 20 a 300 µg de As por dia.^[37]

2.2.1.3 Toxicidade do As

Em 1987, o As foi classificado como uma substância carcinogênica para seres humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), sendo que a exposição crônica ao As inorgânico está associada a diversos tipos de câncer de pele, bexiga, rins, cavidade bucal e intestino, além de conjuntivite, doenças cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso central.^[41] Como já citado, a exposição dos seres humanos ao As pode ocorrer, principalmente, mediante a ingestão de água e alimentos contaminados e poluição ambiental.^{[42],[43]}

Um grande período de tempo de exposição a esse elemento pode resultar em envenenamento crônico por As, também conhecido por *arsenicose*. A ocorrência dessa doença foi reportada em pessoas que habitam áreas endêmicas, com elevada concentração de As na água utilizada para o consumo da população, como Bangladesh e Índia.^[44] Lesões na pele, que incluem mudança de pigmentação (melanose) e queratose das mãos e dos pés são características de envenenamento crônico, e costumam aparecer entre 5 a 15 anos de exposição ao As. A *arsenicose*, doença causada pela exposição excessiva ao As, também pode provocar danos nos órgãos internos do sistema respiratório, digestivo, circulatório, nervoso e renal.^[23]

Sabe-se que o efeito toxicológico desse elemento está diretamente vinculado com a forma química na qual ele se apresenta, além da concentração, tempo de exposição ou

ingestão. Comparando-se a toxicidade das espécies, o As na forma inorgânica é aproximadamente cem vezes mais tóxico do que o As orgânico. Já no que tange o estado de oxidação, as espécies trivalentes mostram-se cerca de sessenta vezes mais tóxicas do que as pentavalentes.^{[1],[3],[38]}

O grau de toxicidade dos compostos de As obedece a seguinte ordem: As elementar < compostos orgânicos de As < compostos orgânicos pentavalentes < arsênio inorgânico (+5) < arsênio orgânico (+3) < arsênio inorgânico (+3) < derivados orgânicos da arsina < arsina (+3).^[1] A AsB e a AsC, compostos conhecidos como arsenoaçúcares, são ditos como sendo formas atóxicas. Pesquisas mostraram que as formas metiladas trivalentes, como o DMA(III) e o MMA(III), são mais tóxicas do que as pentavalentes, DMA(V) e MMA(V).^[38]

Presente no organismo humano, o As acaba por impedir atividades bioquímicas indispensáveis. Na sua forma oxidada, o arsenato possui uma relação de competitividade com o fosfato, inibindo o processo de fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias e, por conseguinte, bloqueando a produção de adenosina trifosfato (ATP), responsável pela produção de energia nos seres vivos. Por outro lado, quando se encontra na sua forma reduzida, coordena-se com grupos tióis (-SH) de enzimas e proteínas, ocasionando perturbações metabólicas.^{[15],[44],[36]}

Os compostos de As podem ser facilmente absorvidos, seja por via oral ou por via respiratória, e a extensão da absorção irá depender da solubilidade de cada composto. Para o As inorgânico, a absorção pulmonar é estimada em 30 a 60% e, por ingestão de As trivalente, aproximadamente 95% dele é absorvido pelo trato gastrointestinal.^[15] De acordo com Souza *et al.*^[15], alguns estudos demonstram que a absorção de MMA e DMA “via” trato gastrointestinal pode corresponder a cerca de 75 a 85%, ainda que também possa se dar por “via” inalatória.

Uma vez presente na corrente sanguínea, o As é distribuído aos eritrócitos e, aproximadamente, após 24 horas é, então, repassado para a maioria dos tecidos. Compostos inorgânicos solúveis são disseminados rapidamente para órgãos ou tecidos ricos em grupos sulfidríla, como fígado, rins, baço e glândulas adrenais e, em razão dessa grande afinidade, o As pode ser detectado em elevadas concentrações em cabelo, pele e unhas, duas a quatro semanas após a exposição. Transcorridas quatro semanas, o As acumula-se nos ossos, resultando na diminuição de sua concentração no fígado e nos rins.^{[15],[36]}

A via urinária é considerada como a principal forma de excreção, sendo que as proporções excretadas de As(III), As(V), MMA e DMA variam de acordo com a dose ou

forma de exposição.^[15] Dessa forma, a urina pode ser considerada como um marcador biológico, permitindo monitorar o grau de contaminação de As no corpo humano.^{[23],[36]}

O As pode sofrer um processo de biotransformação após ser absorvido pelo organismo, o qual envolve duas etapas: (1) reações de redução/oxidação, capazes de interconverter As(III) e As(V) e (2) reações de metilação, onde o As(III) é metilado a MMA(V) e reduzido a MMA(III), sendo após metilado a DMA(V). Esses processos mostram-se similares, tanto para absorção via inalação quanto ingestão. Alguns estudos evidenciaram o fígado como o órgão responsável pelo processo de biotransformação dos compostos de As no organismo humano, por meio da S-adenosilmetionina.^{[15],[36]}

Em 1963, foi recomendado pela *World Health Organization* (WHO) um nível máximo de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As na água para consumo humano. Todavia, com o aumento das evidências que mostravam uma forte ligação entre a exposição a baixas concentrações de As e o risco de câncer, a WHO diminuiu esse nível para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em 1992. Em alguns países, como Bangladesh, Chile, China e Índia, o nível de As tolerável em água para consumo permanece ainda é $50 \mu\text{g L}^{-1}$.^[45]

As doses diárias toleráveis de As, para adultos, foram calculadas e divulgadas pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), sendo $2,1 \mu\text{g/kg}$ peso corporal/dia, o que equivale a 126 a $160 \mu\text{g/As}$ por dia. Embora a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* defenda que a dose mínima de As inorgânico para não haver riscos à saúde deva ser de $0,3 \mu\text{g/kg}$ peso corporal/dia, ou 18 a $23 \mu\text{g/As}$ por dia, passou a ser aceito que as quantidades de As que a maioria da população ingere (em torno de $50 \mu\text{g/dia}$) não chega a ser considerado preocupante para a saúde humana.^[46]

Recentemente, em abril de 2016, a FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) propôs um limite para As inorgânico em alimentos especiais à base de arroz para bebês. Em relação ao peso corporal, o consumo de arroz para bebês, que se dá principalmente através de cereal de arroz infantil, é cerca de três vezes menor do que para adultos. Dessa forma, mediante um projeto de orientações enviado para as indústrias alimentícias, a FDA limitou em 100 ng g^{-1} (ppb) a quantidade de As inorgânico permitido em alimentos à base de cereal de arroz para bebês e crianças.^[47]

Estima-se que centenas de milhares de pessoas ao redor do mundo encontram-se diariamente expostas ao As, tanto mediante o consumo de água, alimentos ou ainda por fontes naturais.^[23] Sendo assim, a saúde da população mundial depende do controle e da pesquisa feita acerca da biodisponibilidade dos compostos arsenicais, tendo em vista que a toxicidade

dos mesmos está diretamente vinculada à forma química na qual o elemento se apresenta, evidenciando a importância da análise de especificação química.

2.3. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS POR As

Os alimentos podem ser contaminados ainda no momento da sua produção, por exemplo, pela água, solo ou fitossanitário aplicado, que contenha compostos de As. É reconhecido que dentre os alimentos que contêm As em quantidade alta estão os peixes, crustáceos e outros frutos do mar que, geralmente, contêm elevadas concentrações de arsenoaçúcares, espécies que são ditas como atóxicas.^[15] As frutas e os vegetais (com exceção do arroz) contêm basicamente As orgânico, sendo a forma inorgânica do elemento menos de 10% do teor total nesses alimentos. No entanto, leites, carnes e cereais contêm majoritariamente o As na forma inorgânica, 65 a 75% do teor total do elemento. Estudos anteriores mostraram que cerca de 85 a 95% do As encontrado em arroz está na forma inorgânica, o que sugeriu a necessidade de mais pesquisas a esse respeito.^[24]

No ano de 1999, um estudo realizado nos Estados Unidos, sobre a concentração de contaminantes nos alimentos contidos na cesta básica dos americanos, revelou altas concentrações de As inorgânico (a forma considerada mais tóxica) no arroz, quando comparado aos outros alimentos analisados. Tal resultado alertou os pesquisadores para a realização de estudos acerca da quantificação e do monitoramento de As no arroz e nos alimentos à base de arroz, tendo em vista a grande importância dos mesmos na alimentação a nível mundial.^{[15],[48]}

Schoof *et al.*^[8] realizaram um estudo envolvendo 40 tipos de alimentos, presentes na alimentação básica dos cidadãos norte-americanos, observando que aproximadamente 90% desses alimentos contribuíam para a ingestão de espécies inorgânicas de As. Nos frutos do mar, a concentração de As inorgânico encontrada foi relativamente baixa, sendo 1-2 ng g⁻¹. As mais elevadas concentrações de As inorgânico foram encontrados no arroz (74 ng g⁻¹), na farinha branca (11 ng g⁻¹), no suco de uva (9 ng g⁻¹) e no espinafre (6 ng g⁻¹). Em outro estudo, Schoof *et al.*^[49] estimaram que a ingestão de As inorgânico na dieta da população dos Estados Unidos variava de 1-20 µg dia⁻¹, em média 3,2 µg dia⁻¹.

Um estudo realizado no México, por Dal Razo *et al.*,^[50] mostrou que o teor de As encontrado em alimentos básicos de consumo local, como feijão, batatas, molho e carne de porco e gado (cozidas), está vinculado com o uso de água contaminada para a preparação e o

cozimento de tais alimentos. Também verificaram maior concentração de As em feijão e sopas de macarrão, enquanto que as *tortillas* (comida típica mexicana) continham menos As.

No Brasil, a Portaria nº 685, datada de 27 de agosto de 1998, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta os limites máximos toleráveis para As total em alimentos. A Tabela 2 mostra os limites estabelecidos para os alimentos, sendo o máximo permitido $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$.^{[51],[52]}

Tabela II: Limites máximos de As em alimentos, definidos pela ANVISA.^{[51],[52]}

Alimento	[As] (mg kg⁻¹)
Gorduras vegetais e emulsões	0,1
Gorduras hidrogenadas	0,1
Açúcares, caramelos e balas	0,1
Bebidas alcoólicas destiladas e fermento-destiladas	0,1
Cereais e produtos de cereais	0,3
Gelados comestíveis	0,1
Ovos e produtos de ovos	0,5
Leites e fluídos prontos para o consumo	0,05
Mel	0,3
Peixes e produtos de peixe	1,0
Chá, mate, café e derivados	0,6
Demais alimentos	0,1

2.3.1 Contaminação do arroz e seus derivados

Após o estudo publicado por Schoof *et al.*,^[8] em 1999, que revelou a presença de As como contaminante em aproximadamente 90% dos alimentos contidos na cesta básica dos americanos, tornou-se expressivamente crescente o interesse em pesquisar espécies do metalóide em alimentos, especialmente em arroz e seus derivados, a nível mundial.

Segundo Souza *et al.*,^[15] muitos estudos foram realizados, relacionando As com arroz, especialmente em regiões onde os solos são naturalmente contaminados com As e/ou onde o consumo deste cereal é elevado. O interesse no arroz e seus derivados deve-se ao fato dessa planta absorver facilmente As e acumulá-lo em seus grãos, sendo capaz de concentrar 10 vezes mais As, em comparação a outros cereais, como milho, trigo, cevada e centeio.^{[3],[7]} Três espécies de As, arsenito, arsenato e DMA são comumente detectados no arroz, sendo

dominante a presença das espécies inorgânicas. Outros compostos de As, como a AsB e o MMA, são ocasionalmente detectados, todavia em menores concentrações.^[16]

Diferentemente de outros alimentos, o arroz é majoritariamente cultivado em solo inundado, conhecido como cultivo irrigado. Nessas condições anaeróbicas, juntamente com o excesso de água empregado, é favorecida uma maior mobilidade de metais e metalóides (como é o caso do As), que acabam por se acumular na planta e nos seus grãos, como é ilustrado na Figura 1. Considerada a espécie mais tóxica encontrada em alimentos, o As(III) tem alta solubilidade em água, o que aumenta sua capacidade de se mover pelo solo, sendo eficientemente absorvido pelas raízes da planta de arroz, chegando até o grão. O acúmulo de As pode afetar o crescimento da planta de arroz, além de diminuir a produtividade.^{[4],[15]}

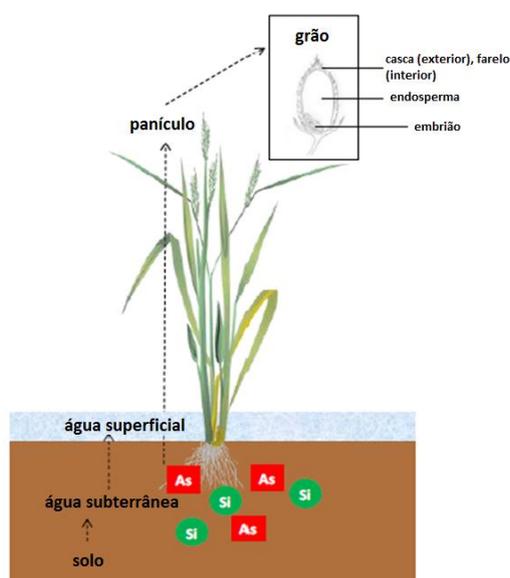


Figura 1: A planta de arroz absorve As, à medida que as raízes absorvem Si, presente na água e no solo, pelo mesmo mecanismo de transporte. As setas indicam o caminho que o As percorre do solo até a água da superfície, depois indo para o panículo e, por fim, para os grãos de arroz. Adaptado de Bhadha *et al.*^[53]

A concentração de diferentes espécies de As no arroz pode ser devido ao meio de crescimento da planta, o que depende dos componentes presentes no solo e na água, intempéries e práticas de agricultura (uso de produtos químicos). A contaminação também é passível de ocorrer durante os diferentes estágios de beneficiamento do arroz, como o polimento do arroz integral para arroz branco ou para parboilizado, principalmente se for usada água contendo As. Maiores concentrações desse metalóide são encontradas no arroz

ainda com farelo, conhecido por arroz integral, sendo o grão de arroz polido o que, em geral, contém menor quantidade de As.^[16]

Como já citado anteriormente, as espécies inorgânicas compõem a maior fração de As encontrado no arroz, em alguns casos chegando a compor aproximadamente 90% do teor total do elemento. Isto pode estar relacionado à semelhança que o As(III) possui com o silício e o As(V) com o fósforo, os quais são absorvidos pelas raiz da planta, com o intuito de fortalecê-la. Todavia, a planta não é capaz de distingui-los das espécies de As, e acaba por absorver erroneamente estas espécies, caso as mesmas estejam presentes no solo ou na água utilizada para a irrigação.^{[16],[54]}

No intuito de controlar a concentração de As inorgânico presente no arroz, a nível mundial, o comitê internacional sobre contaminantes em alimentos, *Codex Alimentarius*, em associação com a FDA e a WHO, estabeleceram um limite máximo tolerável de 200 ng g⁻¹.^[55] Carbonell-Barrachina *et al.*^[56] realizaram um estudo com amostras de comidas especiais à base de arroz para bebês celíacos, comercializadas na Espanha, justificando seu interesse pelo fato de que outros pesquisadores já haviam encontrado altos teores de As nesses alimentos infantis e também porque crianças estão mais suscetíveis aos seus efeitos tóxicos. Nesse estudo, os autores encontraram quantidades de As inorgânico relativamente maiores nos produtos à base de arroz, livres de glúten, apresentando concentrações correspondentes a 60% do teor total de As, quando em comparação com aqueles que continham glúten à base de trigo, centeio, cevada e milho.

Apesar de todos os estudos já realizados e dos valores limites estipulados por essas grandes organizações internacionais, ainda se faz necessários mais pesquisa nessa área. Contudo, métodos de análise de especiação química de As em arroz e alimentos derivados são ainda considerados difíceis de serem implementados nos laboratórios,^[57] por causa da complexidade e por demandarem a utilização de equipamentos de alto custo. Sendo assim, é notável a grande necessidade de se desenvolver métodos mais simples e de menor custo.

2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA

O rápido crescimento da poluição ambiental nas últimas décadas tem aumentado a preocupação com o bem-estar e a saúde da população mundial, e com a manutenção dos ecossistemas.^[58] Assim sendo, no caso do As, é necessário conhecer quais espécies estão presentes no meio, já que as mesmas possuem diferentes toxicidades.

Na análise de especiação química são necessárias duas técnicas complementares; a primeira promove uma separação eficiente e segura, enquanto a outra fornece uma quantificação e detecção adequada. Uma vez que a maioria dos elementos se encontra na forma iônica ou polar na solução da amostra, a determinação direta dessas espécies é restrita. Entretanto, a conversão dessas espécies em compostos voláteis e que sejam termodinamicamente estáveis é possível. Nesse sentido, a HG-AAS tem sido empregada na análise de especiação química de As,^{[59],[60]} sendo gerados hidretos das espécies de As sob condições específicas, as quais são posteriormente detectadas por AAS.

Os estudos mais frequentes de especiação química de As em alimentos tem sido voltados para frutos do mar,^{[61],[62]} peixes^[63-65] e cereais.^{[65],[66]} Lynch *et al.*^[67] realizaram uma revisão abrangente sobre a especiação química de As inorgânico, em diversos tipos de alimentos, incluindo arroz e alguns derivados, a partir de várias publicações datadas de 1985 até 2014. Segundo os autores, a maior concentração média de As inorgânico foi encontrada em algas marinhas quando comparada com outros alimentos ($11.000 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 312$), seguidas pelo arroz e seus derivados, com concentração média de $130 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 1126$) e frutos do mar, também com concentração média de $130 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 835$). A Tabela 3 mostra o número de publicações identificadas por Lynch *et al.*^[67] com informações sobre As inorgânico em cada grupo de alimentos.

Tabela III: Número de publicações envolvendo especificação de As em alimentos, com destaque para o arroz e seus derivados. Adaptado de Lynch *et al.*^[67]

Alimentos	1985-1990	1994-1998	1999-2003	2004-2008	2009-2014	Total
Comidas/bebidas infantis	0	0	0	1	6	7
Bebidas em geral	0	1	4	3	9	17
Condimentos e temperos	0	0	2	1	8	11
Peixes	2	2	7	13	18	42
Frutas	0	0	2	0	5	7
Grãos, farinhas, pães	0	1	1	0	10	12
Carnes	0	1	1	1	7	10
Óleos	0	0	1	0	4	5
Arroz e derivados	0	1	1	10	37	50
Frutos do mar	2	2	8	14	16	42
Algas marinhas	1	0	3	7	13	24
Vegetais e legumes	0	1	4	2	8	15

2.4.1. Preparo de amostras para especificação química

A análise de especificação química não é algo corriqueiro, e inúmeras precauções devem ser observadas, desde a amostragem até a quantificação do analito em questão. A etapa de coleta, o tratamento e a preservação das amostras, tanto para determinação qualitativa quanto quantitativa, requerem planejamento e cuidado. Ainda, essas tarefas são muito mais complexas quando comparadas com os procedimentos para determinação total do elemento. Na análise de especificação química, o procedimento a ser adotado é o de manter a integridade das espécies químicas do elemento nas amostras analisadas, desde o momento da coleta até a análise.

2.4.2. Métodos de extração das espécies de As

A extração das espécies é uma das etapas importantes na análise de especiação química, particularmente no caso do As, uma vez que elas se encontram presente em níveis traço. Resíduos ou matéria orgânica presentes na solução da amostra, ou ainda resquícios de ácido remanescente, podem resultar em efeitos de matriz durante as medições por técnicas espectrométricas.^[16] É muito importante evitar a transformação química das espécies durante esse processo e garantir a extração total de cada uma das espécies de interesse. Os procedimentos de extração mais utilizados são a extração líquido-sólido, extração líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).^[68]

Tendo em vista que em grande parte dos alimentos as espécies químicas que se deseja quantificar estão presentes no estado sólido, o tratamento da amostra é de suma importância para manter a integridade das espécies, bem como proporcionar uma correta quantificação.^[16] Entre os parâmetros mais relevantes a serem observados ao se iniciar o processo de extração das espécies nas amostras encontram-se o procedimento a ser empregado, o tipo de solvente extrator, bem como o tempo e a temperatura requeridos.^[3]

Diversos procedimentos utilizados na análise de especiação química de As em arroz e produtos à base de arroz já foram publicados. Sun *et al.*^[21] utilizaram um método já desenvolvido para especiação de As em alimentos de origem marinha, o qual envolvia ácido nítrico (HNO₃) 2% (v/v) como solvente extrator. Os autores otimizaram o método para HNO₃ 1% (v/v), sendo o mesmo seguido por Signes-Pastor *et al.*^[10]. De forma geral, a grande maioria dos autores empregaram aquecimento brando, com a temperatura da extração variando de 95° a 100°C. Nota-se que, independentemente do método de extração adotado, as suspensões das amostras extraídas foram centrifugadas e, posteriormente filtradas, para então ser realizada a determinação das espécies de interesse, no filtrado.^{[7],[6],[21],[12]}

Meharg *et al.*^[11] realizaram especiação de As inorgânico em leite de arroz, produzidos no Reino Unido. Após utilizarem hexano para remover a gordura do leite, adicionaram HNO₃ 1% (v/v) às amostras em análise, deixando as mesmas em repouso por 24 h à temperatura ambiente. A extração foi realizada em forno micro-ondas, a suspensão deixada esfriar à temperatura ambiente, centrifugada e filtrada para posterior determinação do As.

A extração convencional por via úmida em sistema aberto, com aquecimento em chapa metálica ou banho de água quente (banho-maria), ou bloco metálico, pode ser utilizado na análise de especiação química de As em arroz e seus derivados. Todavia, a extração em

forno microondas é preferida, uma vez que é mais rápida e previne a contaminação da amostra ou a volatilização das espécies de As.^[16]

É de grande relevância a análise de materiais de referência certificados (CRMs), para que se possa assegurar a exatidão e a precisão do método de análise utilizado. O *National Institute of Standards and Technology* (NIST) possui o *CRM Rice Flour 1568a*, com relação à matriz de arroz. Entretanto, para esse material apenas a concentração de As total é certificada.^{[4],[21]} Em 2014, foi produzido outro CRM para a matriz de arroz (ERM B211) pelo *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), o qual certificou as concentrações de As inorgânico ($124 \pm 11 \mu\text{g kg}^{-1}$), DMA ($119 \pm 13 \mu\text{g kg}^{-1}$) e As total ($260 \pm 13 \mu\text{g kg}^{-1}$). Essa certificação deu suporte para o estudo e desenvolvimento de novos métodos de análise de especiação de As no arroz.

Contudo, ainda não há este tipo de certificação para alimentos à base de arroz. Na maioria dos estudos realizados para esses alimentos foi analisada farinha de arroz certificada e/ou feitos testes de recuperação do analito para avaliar a exatidão do método.^{[21],[26]}

2.4.3. Separação, quantificação e detecção das espécies de As

Na análise de especiação química de As é necessário, primeiramente, que ocorra a separação das espécies, para posterior detecção do As.^[38] A espectrometria atômica, associada à cromatografia, tem sido utilizada na maioria dos estudos, possibilitando a determinação de diferentes espécies do elemento, mesmo que estejam presentes em baixas concentrações nas amostras analisadas.^[69]

A cromatografia líquida (LC) é bastante empregada na especiação de As em alimentos, tendo-se em vista os variados tipos de colunas cromatográficas que estão disponíveis comercialmente (fase reversa, adsorção, troca iônica e permeação em gel). O emprego da técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) associada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) mostra-se como a mais utilizada na especiação química de As em arroz e seus derivados, tanto para espécies orgânicas quanto inorgânicas.^{[3],[4],[26-72]} Para determinar o As em cereais matinais e bolachas de arroz, Sun *et al.*^[21] optaram pela técnica de ICP-MS para determinação de As total, e pelo uso de HPLC-ICP-MS para a análise de especiação química do elemento.

A cromatografia gasosa (GC) também é empregada para a separação das espécies de As. No entanto, essa técnica requer que as espécies de As sejam voláteis e termicamente estáveis, à temperatura selecionada para análise. A LC é mais apropriada à separação de

espécies não voláteis, desde que sejam escolhidas colunas adequadas e eluentes compatíveis com os componentes presentes na amostra e sistema de detecção.^[73] A especificação de As mediante o uso da técnica de GC apresenta a desvantagem de necessitar, geralmente, da derivatização da amostra antes da separação das espécies, ao passo que a LC possibilita a separação das espécies sem essa etapa prévia.

Vários estudos comparativos de métodos envolvendo a espectrometria atômica, associada com técnicas cromatográficas (GC ou LC) foram realizados e publicados^[73-75], sendo que o acoplamento da ICP-MS com a GC permite maior sensibilidade para a detecção de As. Todavia, o emprego da LC associada a ICP-MS é considerado mais simples, sendo preferido na análise de especificação química de As.

Ainda que o uso dessas técnicas hifenadas promova elevada sensibilidade e limites de detecção (LD) mais baixos, existem algumas desvantagens, tais como: complexidade do método; instabilidade do plasma, no caso do uso de ICP-MS, ocasionada pelos solventes orgânicos (fase móvel) ou formação de íons poliatômicos interferentes.^[76] Também se deve considerar que são técnicas de alto custo, devido à sofisticação dos equipamentos empregados, exigem considerável experiência e conhecimento por parte do analista. Sendo assim, são técnicas mais difíceis de serem empregadas em análises de rotina.

Nesse sentido, a HG-AAS é vantajosa por ser mais simples e de menor custo, quando comparada às demais supracitadas. Embora seja mais limitada, possui sensibilidade suficiente para a quantificação de As inorgânico em arroz e seus derivados,^[77] conforme será avaliado no presente estudo. A HG-AAS pode ser combinada com sistemas em fluxo, permitindo a quantificação de baixas concentrações de As.

2.5. TÉCNICA DE GERAÇÃO DE HIDRETOS (HG)

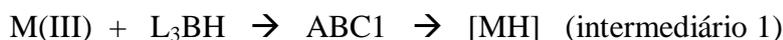
Para a quantificação de As, a HG-AAS ainda é a mais empregada, pois, conforme já citado, possui baixo custo operacional, é simples e suficientemente sensível. O analito presente na amostra líquida é convertido em um composto volátil, sendo os hidretos então gerados por meio de uma reação com um agente redutor. A vantagem da volatilização do analito como um hidreto gasoso está na separação e no enriquecimento do mesmo, resultando, portanto, numa redução ou mesmo completa eliminação de interferentes e aumento de sensibilidade.^[78]

No final da década de 60, período inicial de aplicação da HG-AAS, os hidretos eram gerados mediante reações entre agentes redutores metálicos em meio ácido. Era empregado Zn como redutor metálico, o qual era adicionado à solução da amostra acidificada com ácido clorídrico (HCl), formando arsina (AsH_3) nesse processo. Todavia, havia muitas desvantagens uma vez que, ao usar o Zn como redutor, apenas As, Sn e Se podiam ser determinados. Também, o sinal do branco analítico era alto devido à impureza do metal. Estima-se que apenas cerca de 8% do analito era transformado em hidreto e liberado, sendo um rendimento insatisfatório para determinação de elementos traço.^[78]

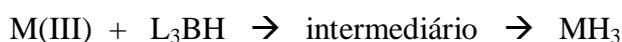
Dessa forma, tornou-se preferível o uso de sais de tetrahidroborato, como o de sódio (NaBH_4) como agente redutor, em meio ácido, na geração de hidretos. Além de ser mais eficiente, esse redutor proporciona baixo sinal do branco e diminui o tempo de reação, melhorando assim a precisão. Entretanto, o NaBH_4 possui a desvantagem de ser instável em solução aquosa, necessitando a mesma ser preparada para uso imediato. Pode-se aumentar a estabilidade dessa solução mediante sua alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH) ou de potássio (KOH).^[38]

Para o mecanismo da reação de geração de hidreto, duas hipóteses foram formuladas. Na primeira (a), os átomos de hidrogênio que formam o hidreto do analito são provenientes de diferentes moléculas do íon tetrahidroborato, originando dois intermediários. Já a segunda hipótese (b), sugere que os átomos de hidrogênio formadores do hidreto do analito provêm da mesma molécula do íon tetrahidroborato.^{[79],[80]}

- Hipótese (a)



- Hipótese (b)



sendo, M o elemento de interesse, ABC os complexos intermediários e $\text{L} = \text{H}^-$, H_2O ou OH^- .

O NaBH_4 proporciona a imediata formação dos hidretos, devendo a concentração deste redutor ser escolhida de acordo com o elemento de interesse e o sistema utilizado. Dessa forma, podem-se gerar hidretos voláteis de vários elementos, com boa separação do analito da matriz, o que diminui interferências, e aumenta a eficiência de transporte do analito para o atomizador (pode chegar a 100%), melhorando a sensibilidade e o LD.^{[81],[82]}

Contudo, compostos como a AsB, AsC, arseno-açúcares e outros não são capazes de formar hidretos voláteis com o NaBH_4 . Outras limitações deste método consistem na dependência do pH e das concentrações dos reagentes, que podem vir a ser críticos para alguns elementos, assim como os estados de oxidação do analito podem influenciar na geração do hidreto.^[83] Todavia, o emprego de agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou redutores como ácido ascórbico/iodeto de potássio ou a L-cisteína podem contornar o problema.^{[57],[81]}

2.5.1. Análise de especiação química de As mediante geração de hidretos

A técnica de HG depende fortemente do estado de oxidação em que o As encontra-se na solução da amostra, sendo que, geralmente, a espécie com menor estado de oxidação irá produzir mais eficientemente o hidreto, devido à vagarosa cinética de conversão que há entre o As(V) para As(III).^[81]

Outro fator ao qual a HG é subordinada é o pH do meio, sendo que em meio muito ácido (pH entre 0 e 1,5), os hidretos são originados a partir de espécies orgânicas e inorgânicas de As, o que não depende do estado de oxidação do elemento. Já em valores de pH aproximadamente neutros, entre 6 e 7, apenas as espécies provenientes de As(III) são capazes de gerar os hidretos.^[81]

A concentração do ácido empregado para deixar o meio redutor, no caso o HCl, é um fator relevante para a geração seletiva dos diferentes hidretos de As, uma vez que em forte meio ácido o As(V) é facilmente reduzido a As(III), gerando a AsH_3 . O NaBH_4 , agente redutor empregado, proporciona uma formação imediata dos hidretos, sendo que sua liberação da solução pode ocorrer entre 10 e 30 s. De acordo com a espécie de interesse e o sistema escolhido, deve-se avaliar a concentração de redutor a ser utilizada. Dessa forma, diversas concentrações são recomendadas, variando de 0,5-10,0% (m/v) para sistemas em batelada e 0,1-1,0% (m/v) para sistemas em fluxo, devendo todas as soluções serem estabilizadas com KOH ou NaOH. Em suma, mediante a otimização dos parâmetros reacionais (concentração do

ácido e do redutor), a técnica de HG é capaz de gerar de forma seletiva os hidretos das espécies de As inorgânico.

Para análise de especiação química de As em amostras de água e alimentos, a geração de hidretos já foi eficientemente aplicada.^{[59],[84-88]} Borba *et al.*^[59] utilizaram a HG-AAS para a determinação de As total, assim como para a especiação de As, em águas subterrâneas do Quadrilátero Ferrífero, em MG, sendo que a concentração de HCl variou de 4 a 10 mol L⁻¹ e a de NaBH₄ de 0,1 a 0,5% (m/v), respectivamente. Farias *et al.*^[84] empregaram a análise por injeção em fluxo combinada com a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (FIA-HG-AAS) para a especiação química de As inorgânico na Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul (RS), em que foram utilizados HCl 3 mol L⁻¹ e NaBH₄ e 0,3% (m/v). Já Musil *et al.*^[87] utilizaram HG-ICPMS na análise de especiação química de As em arroz e frutos do mar onde, otimizando as condições da análise, escolheram a concentração de 4 mol L⁻¹ para o HCl e 0,5% (m/v) para o NaBH₄.

Com o intuito de quantificar as espécies de As inorgânico presentes no arroz, a geração seletiva de hidretos, associada a outras técnicas de espectrometria atômica, tem sido empregada.^[86-89] Chen *et al.*^[86] utilizaram a HG-AFS (geração de hidretos - fluorescência de emissão atômica) para realizar a análise de especiação química de As em arroz, empregando, para a geração dos hidretos, HCl 4,8 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,7% (m/v). O LD do As inorgânico foi 1 ng g⁻¹. Ainda, os autores compararam os resultados obtidos por HG-AFS com os obtidos por HPLC-ICP-MS, observando que os resultados para ambas foram bem próximos. Dessa forma, afirmaram que o emprego da HG-AFS é eficiente e com a grande vantagem de possuir um custo operacional bem mais baixo que a HPLC-ICP-MS, possibilitando que laboratórios de análises de alimentos possam incluir em seus escopos a determinação de As inorgânico. Empregando a técnica de geração de hidretos, acoplada a de ICP-MS, Musil *et al.*^[87] determinaram As inorgânico e total em arroz, utilizando HCl 5 mol L⁻¹ e NaBH₄ 2% (m/v) para a geração de hidretos, conseguindo alcançar um limite de detecção de 1,1 ng g⁻¹ para o As inorgânico.

Rasmussen *et al.*^[89] empregaram HG-AAS para determinar o As inorgânico presente em arroz e bolachas de arroz, sendo a separação das espécies inorgânicas realizada por SPE (extração em fase sólida). Neste caso, a separação do As inorgânico foi realizado previamente à geração de hidretos de As. Cerveira *et al.*^[88] desenvolveram um método para determinação de As total e inorgânico em arroz, utilizando HG-AAS. Para a geração seletiva da arsina a partir do As(III), foi utilizado HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v). Já para o As inorgânico,

os autores realizaram a pré-redução do As(V) utilizando ácido ascórbico (1% m/v) e iodeto de potássio (0,2% m/v), na presença de HCl 1,2 mol L⁻¹, determinando o As nas mesmas condições empregadas para o As(III); a concentração de As(V) foi obtida por diferença. Este método desenvolvido por HG-AAS foi pioneiro, porquanto o As inorgânico pode ser quantificado mediante a geração seletiva dos hidretos, ou seja, pela utilização de HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v) e foi comprovado que somente havia formação de hidretos a partir do As (III). O MMA também forma hidretos nas mesmas condições do As (III), mas a espécie MMA geralmente não é detectada no arroz.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi a análise de especiação química de As inorgânico em alimentos derivados do arroz, utilizando-se a técnica HG-AAS. Para tanto, foi avaliada a extração das espécies de As inorgânico nas matrizes analisadas, bem como a exatidão do método de quantificação, mediante testes de recuperação do analito (As inorgânico e As(III)). A metodologia utilizada é baseada em outra já desenvolvida para análise de especiação química de As em arroz, também mediante HG-AAS, sendo esta adaptada para outras matrizes: os alimentos à base de arroz.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

As medidas para determinação de As foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica Anaalyst 200, proveniente da PerkinElmer, equipado com sistema de correção de fundo com lâmpada de deutério, em conjunto ao sistema de injeção em fluxo comercial FIAS 100, também da PerkinElmer. A introdução de ar no separador gás líquido foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica, da marca Gilson. Como atomizador, foi empregada uma cela de quartzo convencional, aquecida a uma temperatura de 900 °C.

Como fonte de radiação, utilizou-se uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL), a qual operava a 400 mA. O comprimento de onda selecionado foi 193,7 nm, onde a largura da fenda do monocromador correspondia a 0,7 nm. Todas as medidas foram obtidas em absorbância integrada.

Para a geração dos hidretos de As foi utilizado o sistema esquematizado na Figura 2, no qual a amostra entra em contato com o carreador, no caso o HCl, por meio da válvula (a) e posteriormente é misturada com o agente redutor, o NaBH₄, na confluência (b). Após, a mistura reacional é transportada para o separador gás-líquido, no qual o gás argônio (Ar) auxilia no transporte dos hidretos voláteis até o atomizador. O resíduo gerado dessas etapas é removido do separador gás-líquido por gravidade para um frasco apropriado, para posterior descarte.

Para a propulsão das soluções de HCl e NaBH₄ foram empregados tubos Tygon de coloração vermelho-branco, enquanto que um tubo de Tygon preto-branco foi utilizado para introduzir ar no separador gás-líquido. Um tubo de politetrafluoretileno (PTFE) de 100 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno foi empregado para o transporte da solução presente na confluência para o separador de gás-líquido. Esse separador gás-líquido, o qual se apresenta no formato da letra U, foi desenvolvido no próprio laboratório.

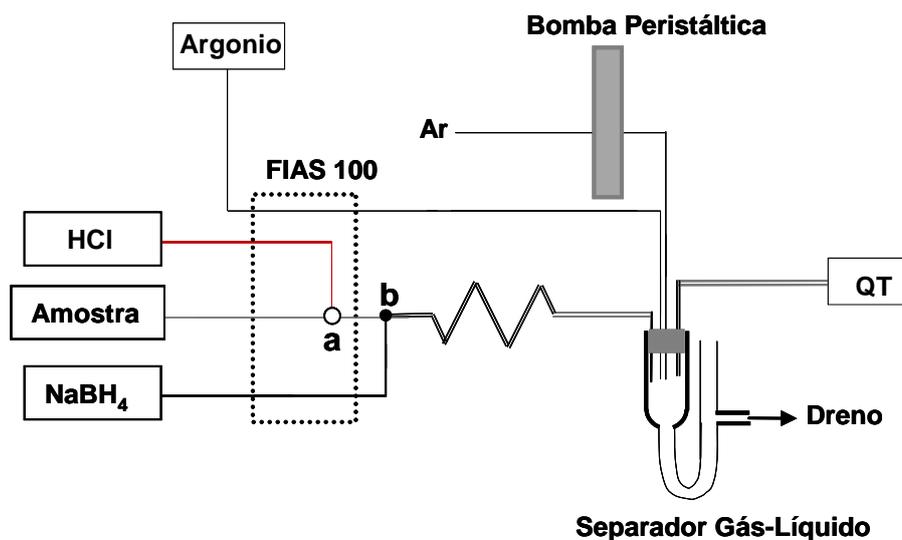


Figura 2. Esquema do sistema empregado para a geração de hidretos e posterior detecção do As mediante a técnica de AAS. O carreador utilizado foi o HCl (4 mL min^{-1}) e o agente redutor foi o NaBH₄ (4 mL min^{-1}); alça de amostragem: $250 \mu\text{L}$; vazão de argônio: 50 mL min^{-1} e vazão de ar introduzido no separador gás-líquido: $1,65 \text{ mL min}^{-1}$; QT: célula de quartzo.

A extração das amostras de derivados de arroz, para a posterior determinação do teor de As, foi realizada mediante aquecimento em placa metálica, modelo Ika-Works RH basic1, em tubos de vidro, juntamente com a solução extratora. Para realizar a extração das espécies de As, empregou-se também um forno de micro-ondas da marca Berghof (Seedwave 4). Para a separação das fases da suspensão das amostras, utilizou-se uma centrífuga da marca Fanem (Modelo Baby 206). Todas as pesagens necessárias ao longo do estudo foram realizadas em balança analítica digital Shimadzu, modelo AUY220, com precisão de $0,0001 \text{ g}$.

4.2. MATERIAIS E REAGENTES

Todas as amostras e soluções empregadas nesse estudo foram preparadas com água deionizada e purificada, com resistividade de $18,2 \Omega\text{cm}$, no sistema Milli-Q, da marca Millipore. Os ácidos clorídrico (HCl, 37% m/m) e nítrico (HNO₃, 65% m/m), ambos de grau analítico, da marca Merck, foram empregados no presente estudo. As soluções de NaBH₄, necessárias para as análises por HG-AAS, foram preparadas diariamente a partir de NaBH₄

com pureza de 99% (marca Acros Organics) e estabilizadas em hidróxido de sódio (NaOH) 0,01% (m/v), também da marca Merck.

Para a extração do As total nas amostras, empregou-se persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$, marca Synth) como agente oxidante. Posteriormente, para realizar a redução das espécies pentavalentes de As, ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$, marca Nuclear) e iodeto de potássio (KI, marca Vetec) foram utilizados. Para a pré-redução do As(V) a As(III), na determinação do As inorgânico, uma solução 5% (m/v) de iodeto de potássio e 1% (m/v) de ácido ascórbico foi preparada em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, no momento do uso.

Uma solução estoque contendo 100 mg L^{-1} de As(III) foi preparada por dissolução de As_2O_3 (Merck) em água previamente sonicada durante 30 minutos a fim de remover o oxigênio dissolvido. Soluções estoque contendo 1.000 mg L^{-1} de As(V), ou DMA ou MMA foram adquiridas da Merck, Sigma Aldrich e Chem Service, respectivamente. Quando necessário, foram preparadas soluções das espécies em HNO_3 1% (v/v).

As soluções de calibração de As(III), para a análise de especiação química de As, foram preparadas em HNO_3 1% (v/v) a partir de adequada diluição da solução estoque de As(III). As concentrações das soluções de calibração, em $\mu\text{g L}^{-1}$, foram as seguintes: 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 para As(III) e As(V). Na determinação de As inorgânico, as soluções de calibração de As(V) foram preparadas em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ + KI 4% (m/v) + ácido ascórbico 0,8% (m/v), mediante adequada diluição da solução de As(V). As soluções de calibração para a determinação de As total foram preparadas em $K_2S_2O_8$ 0,4% (m/v) e HNO_3 1% (v/v), mesmo meio da solução das amostras. Para as amostras líquidas, as soluções de calibração foram preparadas em HNO_3 1% (v/v).

4.2.1 Limpeza do material utilizado

Os frascos de polipropileno utilizados para armazenamento das amostras, bem como a vidraria em geral, foram deixados imersos em HNO_3 10% (v/v) e HNO_3 50% (v/v), respectivamente, por um período mínimo de 48 horas. Transcorrido esse período, enxaguou-se os frascos com água ultrapura e então os mesmos foram deixados para secar à temperatura ambiente. A cela de atomização empregada nas análises, quando necessário realizar sua limpeza, era deixada imersa em uma solução de HNO_3/HF , na proporção 7:3, por 10 minutos, sendo em seguida enxaguada com água ultrapura e deixada secar à temperatura ambiente.

No presente estudo, foram utilizadas duas celas de quartzo; uma utilizada na determinação de As(III) e As total e a outra na determinação de As inorgânico, após pré-redução do As(V). Isso porque a sensibilidade variava, pois a superfície interna da cela sofria modificações após o uso da solução redutora, composta pelo iodeto de potássio e ácido ascórbico. A absorvância do As diminuía após o uso da solução redutora.

4.3. AMOSTRAS E PREPARO

Os alimentos derivados de arroz analisados no presente estudo foram adquiridos no comércio local de Porto Alegre, RS. A lista das amostras sólidas encontra-se na Tabela IV. Aproximadamente 100 g de cada amostra sólida foram cominuídas em gral de ágata, sendo, então, peneiradas com o intuito de se obter partículas com diâmetro menor do que 0,08 mm. As amostras de bolachas, arroz para sushi e massa foram primeiramente moídas em liquidificador industrial e, após, cominuídas em gral de ágata.

Tabela IV. Relação das amostras de alimentos sólidos à base de arroz analisadas.

Alimento	Tipo de arroz empregado
Farinha	Branco (polido)
Farinha	Integral
Farinha	Biodinâmico orgânico integral
Leite em pó	Branco (polido)
Mistura para bolo	Branco (polido)
Bolo de caneca	Branco (polido)
Massa oriental	Branco (polido)
<i>Cookies</i>	Integral
Creme	Branco (polido)
Arroz pré-cozido	Integral
Bolacha	Integral
Arroz para sushi	Branco (polido)
Bolacha com orégano	Orgânico integral

Tabela V. Relação das amostras líquidas dos produtos à base de arroz analisadas e respectivos fatores de diluição nas análises efetuadas.

Alimento	Tipo de arroz empregado	FD
Bebidas lácteas (coco e avelã)	Orgânico	10
Vinagre	Branco polido	4
Vinho	Branco polido	2
Cerveja	Branco polido	5

FD: Fator de diluição

Para avaliar a exatidão do método empregado realizaram-se testes de recuperação do analito, adicionando-se quantidade conhecida do mesmo antes da extração das amostras sólidas ou diluição das amostras líquidas, como discutido adiante, na seção correspondente a resultados e discussão.

4.3.1 As Total

Para a determinação do As total presente nas amostras sólidas, seguiu-se o método de extração já otimizado para arroz.^[90] Cerca de 250 mg de amostra do alimento à base de arroz, já previamente cominuída, foram exatamente pesados e então transferidos para frascos graduados de vidro, onde adicionou-se 1 mL de HNO₃ 10% (v/v) e 2 mL de solução de K₂S₂O₈ 2% (m/v). A mistura resultante foi homogeneizada com o auxílio de um agitador tipo vórtex e após foi aquecida em banho-maria, em copo béquer sobre chapa de aquecimento, de 80 a 90°C por 3 horas. Transcorrido esse tempo, a mistura foi deixada resfriar à temperatura ambiente e em seguida o seu volume foi elevado a 10 mL mediante adição de água deionizada. A próxima etapa consistiu em centrifugar a mistura a 1600 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos, sendo o sobrenadante reservado para posterior determinação do As total por HG-AAS. A extração foi realizada com K₂S₂O₈ e HNO₃ diluído porque em estudo anterior^[88] foi verificado não ser possível à quantificação do As total na amostra submetida à decomposição com ácido. No caso das amostras líquidas, como já citado anteriormente, o único tratamento foi a diluição das mesmas com HNO₃ 0,28 mol L⁻¹.

4.3.2 Procedimento utilizado para especiação química de As

Para realizar a extração das espécies de As presente nas amostras, seguiu-se a metodologia proposta por Calle *et al.*^[91], já empregada em estudo anterior por Cerveira *et al.*^[88] De acordo com esse procedimento, pesou-se 500 mg de amostra e adicionou-se 5 mL de HNO₃ 0,28 mol L⁻¹, deixando-se a mistura repousar por 12 horas (“*overnight*”). Após esse período, as espécies de As foram extraídas mediante a aplicação de radiação micro-ondas (5 min. a 50 °C; 5 min. a 75 °C e 30 min. a 95 °C), em forno.

Transcorrido o tempo necessário para a extração, as amostras foram deixadas em repouso até que atingissem a temperatura ambiente e, então, a suspensão obtida foi transferida para frascos de polipropileno e o volume elevado a 14 mL com HNO₃ 0,28 mol L⁻¹. A suspensão final foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante reservado para posterior análise por HG-AAS.

Seguiu-se também outro método de extração das espécies de As, sugerido por Huang *et al.*^[3]. Neste caso, pesou-se 250 mg de amostra e transferiu-se para frasco de polipropileno graduado, ao qual foram adicionados 5 mL de HNO₃ 0,28 mol L⁻¹. A mistura resultante foi aquecida a 95 °C por 90 minutos, em banho-maria em copo de béquer, com o auxílio de uma chapa de aquecimento. Passado esse tempo, e após atingir a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 1600 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado e reservado para posterior determinação de As(III) e As inorgânico por HG-AAS. Resultados similares foram obtidos para os dois procedimentos de extração (em forno microondas ou aquecimento em banho-maria), o mesmo encontrado por Cerveira *et al.*^[88] As amostras líquidas foram apenas diluídas com HNO₃ 0,28 mol L⁻¹, cujos fatores de diluição são citados na Tabela V.

Para a redução do As, com solução contendo KI e ácido ascórbico em HCl 1,2 mol L⁻¹, 5% (m/v) e 1% (m/v), respectivamente, a solução da mistura redutora era adicionada às soluções de calibração e amostras líquidas (diluídas), ou sobrenadante da amostra sólida centrifugada. Essa solução foi adicionada às soluções de calibração e amostras e, após um período de 60 minutos de repouso, as mesmas foram diluídas, obtendo-se soluções onde as concentrações finais de KI, ácido ascórbico e HCl eram 2,5% (m/v), 0,5% (m/v) e 0,24 mol L⁻¹, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

No presente estudo seguiu-se método já desenvolvido para determinação de As em arroz.^[88] Após avaliação, parte das condições otimizadas foram mantidas para a realização do estudo atual. A seguir serão apresentadas as condições empregadas no presente trabalho, bem como discutidos os resultados encontrados.

5.1.1 Efeito da adição de ar no separador gás-líquido

Testes preliminares realizados por Cerveira *et al.*^[88] mostraram baixa sensibilidade e precisão na determinação de As, através da instrumentação utilizada para HG-AAS. A fim de contornar o problema, os autores introduziram ar no separador gás-líquido, de forma a aumentar a quantidade de gás oxigênio presente na célula de quartzo, o que favorece a formação de radicais no interior do atomizador (nesse caso, a cela de quartzo). Comparando as absorvâncias encontradas para diferentes concentrações de NaBH₄ (de 0,1 a 1,5% m/v) e para diferentes valores de vazão de ar, foi constatado que a absorvância aumentou consideravelmente com a adição de ar no sistema, quando utilizado NaBH₄ 0,5% (m/v).

Dois testes semelhantes foram realizados no presente estudo, com o intuito de melhor avaliar o comportamento da absorvância obtida para As (III) sob diferentes vazões de ar e concentrações de NaBH₄. Como é possível observar na Figura 3, para concentrações de NaBH₄ de 0,1 e 0,25% (m/v), o ar introduzido a diferentes vazões não mostrou influência na absorvância lida. No entanto, para concentrações de 1,0 e 1,5% de redutor, o ar introduzido aumentou a absorvância lida para o As(III), sendo esse aumento até duas vezes maior.

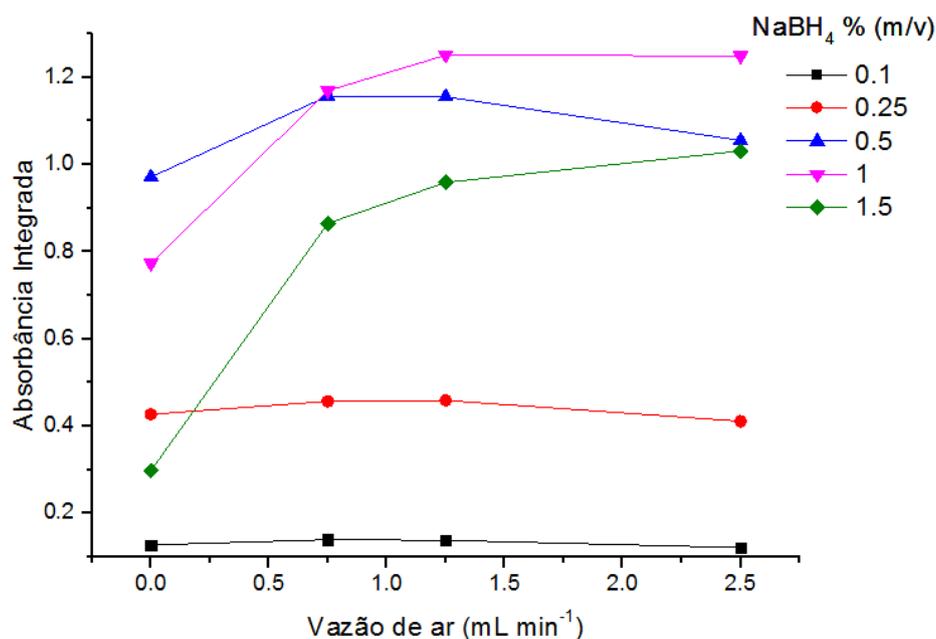


Figura 3. Influência da adição de ar no separador gás-líquido na absorvância do As para 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As (III); como carreador da solução de As foi utilizado HCl 6 mol L⁻¹.

Na Figura 4 é possível observar que para todas as concentrações utilizadas de NaBH₄ houve aumento da absorvância lida para o As(III), devido à adição de ar no sistema. O aumento da absorvância foi menor para as concentrações de 1,0 e 1,5% de redutor. A baixa absorvância deve-se à excessiva quantidade de redutor, o qual gera muito hidrogênio, diluindo a nuvem atômica no interior da cela de quartzo. Além disso, poderia dificultar a reação com oxigênio. Sendo assim, o ar adicionado não influenciou. O maior aumento da absorvância foi observado para NaBH₄ 1,5%, quando adicionado ar ao sistema. Após a realização destes testes, optou-se pela vazão de 1,65 mL min⁻¹, valor onde se observou melhores resultados na absorvância lida para as soluções de As(III).

Uma vez que a atomização dos hidretos numa cela de quartzo aquecida ocorre devido às colisões com radicais livres de H, formados por decomposição de moléculas de hidrogênio, e que esses radicais são formados mediante reações entre o hidrogênio e o oxigênio, o aumento deste por meio da adição de ar ao separador gás-líquido pode ter ajudado a aumentar a produção de radicais livres, ocasionando um aumento na absorvância do As, como observado nas Figuras 3 e 4. Nos casos em que houve diminuição da absorvância, para vazões mais altas de ar, possivelmente seja devido ao consumo de hidrogênio.^[92] Contudo, trata-se de um mecanismo complexo, que demanda estudos mais aprofundados.

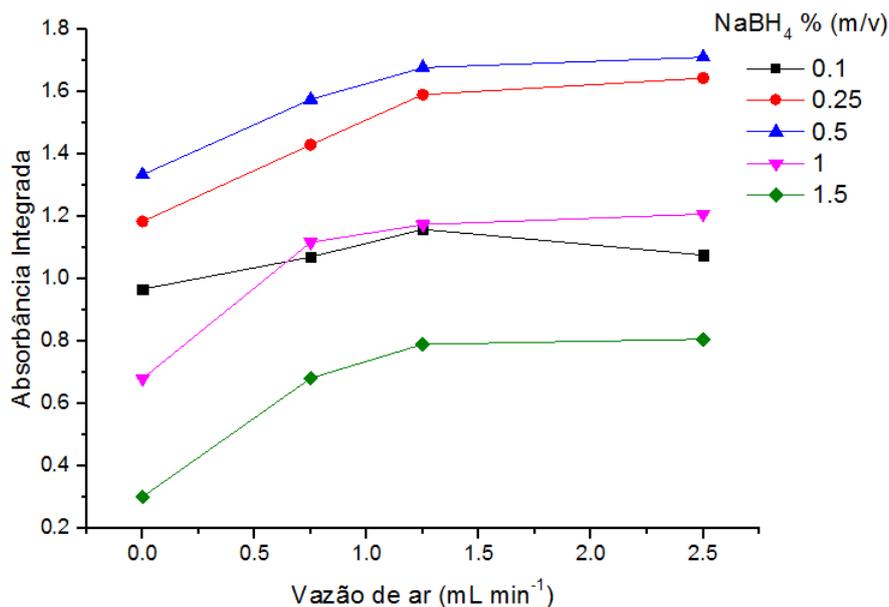


Figura 4. Influência da adição de ar no separador gás-líquido na absorvância do As (III), na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$; o carreador da solução de As (III) foi o HCl 10 mol L^{-1} .

5.1.2 Efeito do gás de arraste, da alça de reação e da vazão dos reagentes

Outras condições do método desenvolvido por Cerveira^[90], foram avaliadas com o intuito de otimizar tal método para determinação de As total e especiação do As inorgânico, nos alimentos à base de arroz.

Primeiramente, avaliou-se a influência do gás de arraste, no caso o gás argônio (Ar), introduzido no separador gás-líquido, que auxilia no transporte do hidreto até o atomizador. Os resultados obtidos foram similares aos mostrados na Figura 5, onde é possível observar acréscimo da absorvância em função do aumento da vazão do gás Ar, de 40 para 50 mL min^{-1} , devido ao melhor transporte do hidreto para a cela de quartzo. Todavia, para vazões acima de 75 mL min^{-1} foi observada uma queda do sinal analítico, a qual pode estar relacionado com uma maior dispersão do hidreto no atomizador, diminuindo a absorvância como consequência. Assim, escolheu-se a vazão de 50 mL min^{-1} , considerando-se a sensibilidade e reprodutibilidade do sinal analítico obtido, mesma vazão que já havia sido estabelecida por Cerveira^[90].

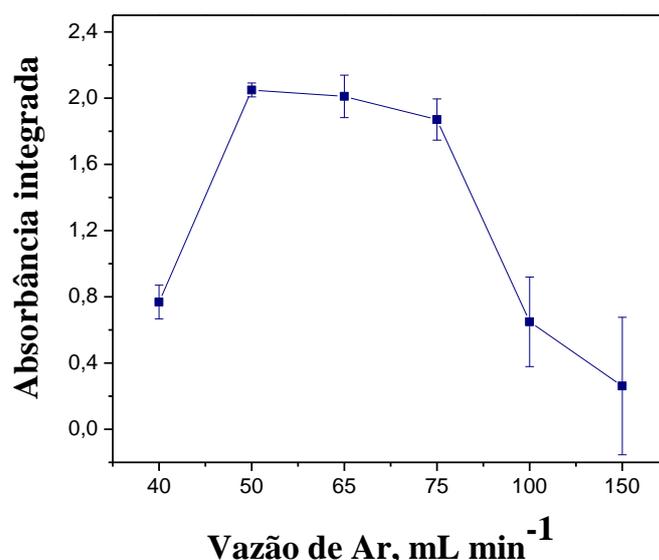


Figura 5. Efeito observado para a vazão do gás de arraste na absorbância integrada do As(III) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições utilizadas: NaBH_4 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L^{-1} . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações. Adaptado de Cerveira.^[90]

Outra condição avaliada na sequência foi o efeito causado pela alça de reação, tendo em vista que seu volume é um fator muito relevante, porquanto promove a mistura entre o redutor NaBH_4 e o carreador HCl , para a geração de hidretos. Em estudo anterior,^[90] Cerveira testou duas alças de reação com diferentes comprimentos, 15 cm e 100 cm. Considerando-se sensibilidade e precisão, a melhor resposta foi obtida quando foi utilizada a alça de 100 cm, sendo o mesmo observado na presente investigação. Devido ao pequeno volume, a absorbância é muito baixa quando uma alça de reação de 15 cm é utilizada, aumentando a imprecisão dos resultados. O volume de amostra que passa pela alça de reação de 100 cm é $250 \mu\text{L}$.

Por fim, foi necessário avaliar a vazão dos reagentes, sendo eles o agente redutor (NaBH_4) e o carreador (HCl), na eficiência da geração dos hidretos. Considerando-se um intervalo de 2 a 6 mL min^{-1} e, de acordo com o mostrado na Figura 6, o aumento da vazão dos reagentes até 4 mL min^{-1} acarretou numa melhor sensibilidade na determinação do As, sendo essa a vazão escolhida. Aumentando-se ainda mais a vazão dos reagentes, uma diminuição do sinal analítico foi registrada. Sendo assim, para a determinação de As nos produtos derivados

de arroz, também optou-se pela vazão de 4 mL min^{-1} , tanto para o redutor (NaBH_4) quanto o carreador (HCl), a mesma vazão escolhida por Cerveira.^[90]

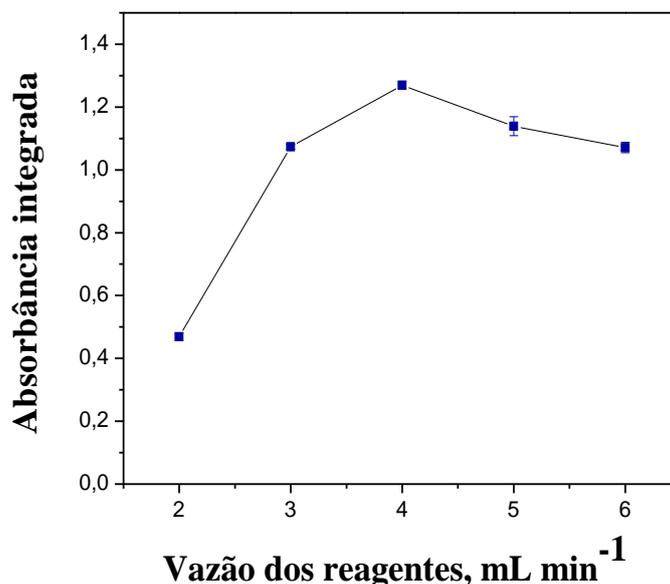


Figura 6. Efeito da vazão do NaBH_4 e do HCl na absorbância integrada do As(III) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições utilizadas: NaBH_4 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L^{-1} . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações. Adaptado de Cerveira^[90].

5.1.3 Influência das concentrações do HCl e NaBH_4

Conforme estudo anterior,^[90] utilizado como referência para a realização do presente trabalho, foi verificada a influência das concentrações do carreador (HCl) e do agente redutor (NaBH_4), visto que eles interferem diretamente na geração dos hidretos de As . Para avaliar o efeito da concentração do redutor na geração dos hidretos das espécies As(III) , As(V) , DMA e MMA , preparou-se soluções contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, bem como soluções de NaBH_4 com concentrações que variaram de 0,1 a 1,5% (m/v). De acordo com estudos anteriores^{[57],[87],[93]}, é possível a determinação seletiva das espécies inorgânicas de As utilizando concentrações moderadas de HCl (de 4 a 6 mol L^{-1}) e NaBH_4 2% (m/v).

Como mostrado na Figura 7, fixando-se a concentração do HCl em 6 mol L^{-1} , para toda faixa de concentração de NaBH_4 avaliada, ocorre a geração de hidretos das espécies de As , com uma contribuição significativa dessas na geração dos hidretos; dessa forma, não foi possível realizar a separação das espécies nessas condições. Salienta-se que é necessário

limitar a concentração máxima de redutor em 1,5% (m/v) devido à grande produção de hidrogênio que ocorre, o que eleva a instabilidade do sistema e prejudica a precisão das medidas.

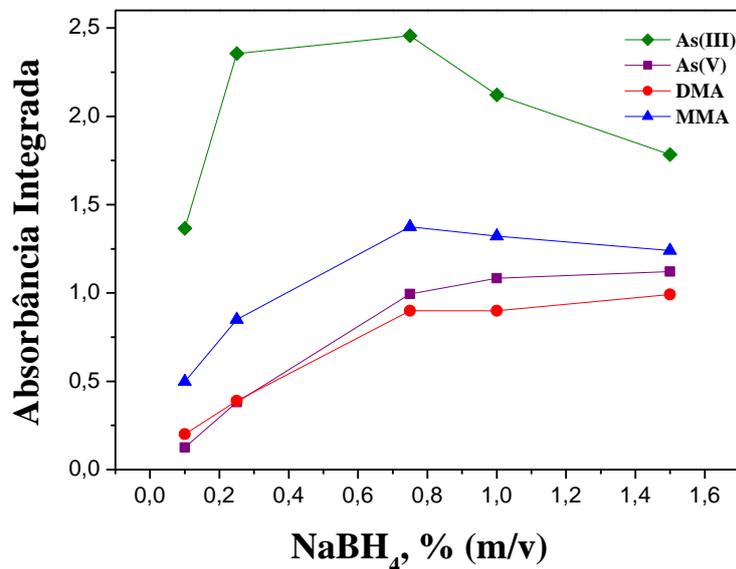


Figura 7. Influência da concentração do NaBH₄ nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie. O carreador utilizado foi o HCl 6 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira.^[90]

Conforme mostrado na Figura 8(a), com o aumento da concentração do ácido, melhores resultados foram obtidos, ocorrendo aumento da absorbância do As(III), sendo que para as espécies de As(V) e MMA não houve mudanças significativas e para o DMA houve um abaixamento gradativo no sinal analítico. Aumentando-se a concentração do HCl para 10 mol L⁻¹, as absorbâncias relativas às espécies As(V) e DMA foram equivalentes àquela do branco analítico, sendo que a variação da concentração do redutor resultou em comportamento similar, como é possível verificar na Figura 8(b).

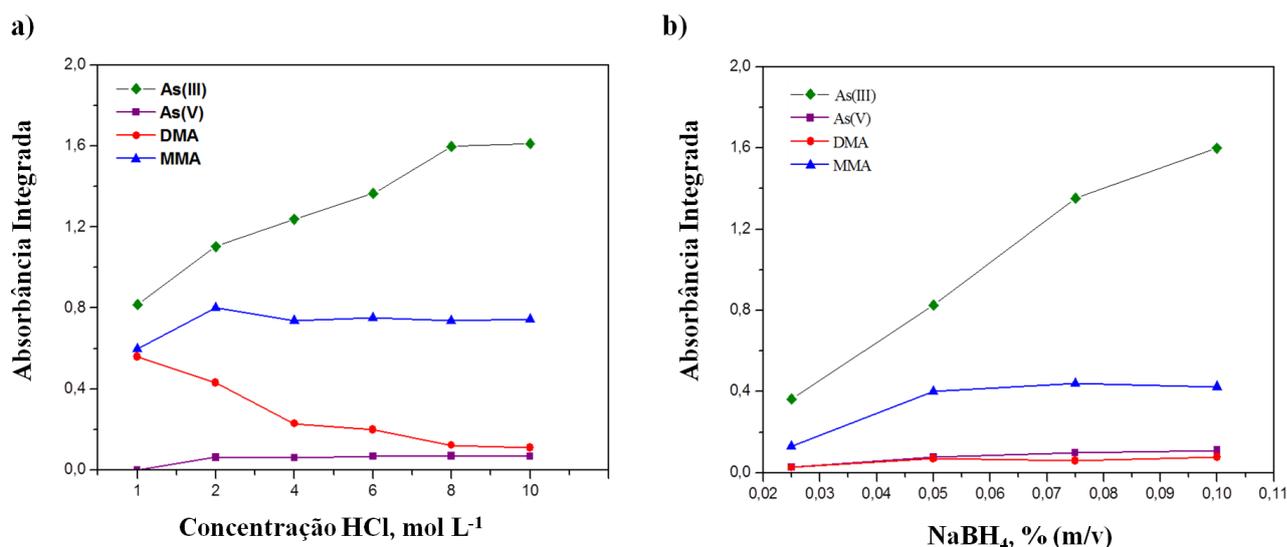


Figura 8. Influência das concentrações do HCl (a) e do NaBH₄ (b) nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie. Condições utilizadas: (a) NaBH₄ 0,1% (m/v); (b) HCl 10 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira.^[90]

Ao observar os resultados mostrados na Figura 8(b), nota-se que em altas concentrações de HCl e baixas concentrações de NaBH₄ é possível detectar apenas o As(III) e o MMA, uma vez que o sinal analítico obtido para as espécies As(V) e DMA podem ser desconsiderados. Musil *et al.*^[87] reportaram que a menor eficiência observada para a geração dos hidretos das espécies metiladas está relacionada à protonação dessas em meio muito ácido. Lehmann *et al.*^[94] explicaram que em condições fracamente ácidas até pH neutro, o processo de redução do As(V) a As(III) para a geração da arsina não envolve cinética e termodinâmica favoráveis, em razão do aumento do pH inibir o potencial de redução.

Todavia, conforme observado por Cerveira,^[90] mesmo em meio fortemente ácido, o As(V) não foi reduzido a As(III), demonstrando que em altas concentrações de HCl e baixas concentrações de redutor, a formação da arsina a partir do As(V) não é viável. Já foi relatado em publicações posteriores que o MMA geralmente não é detectado no arroz.^{[57],[95]} Com isto, a geração seletiva de hidretos de As (III) em arroz é possível. Sendo assim, optou por empregar HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v), para a determinação seletiva do As(III), considerando-se o MMA ausente também nos produtos derivados do arroz, tendo em vista que os mesmos também são oriundos do cereal.

5.2 CONDIÇÕES PARA A REDUÇÃO DO As INORGÂNICO

Uma vez que as condições de acidez do meio e a concentração do agente redutor necessárias para a quantitativa geração dos hidretos de As(III) e As(V) não são iguais, a eficiência para gerar os hidretos também não é igual. Assim, para a determinação das espécies inorgânicas é necessário que o As pentavalente seja previamente reduzido a As(III) antes de ser determinado. Dois diferentes agentes pré-redutores, com o intuito de determinar o As inorgânico nas mesmas condições do As(III), são geralmente utilizados: solução de L-cisteína 2%(m/v) e solução contendo KI/ácido ascórbico.

Com o emprego da L-cisteína, já foi observada redução da absorbância,^[90] chegando ao nível daquela do branco analítico. Após lavagem e ativação da cela de quartzo, foi observado o retorno do sinal analítico, mas ao analisar uma solução da amostra adicionada de L-cisteína 2% (m/v), notou-se novamente a perda do sinal analítico. Sendo assim, foi constatada a inviabilidade do uso da L-cisteína como agente redutor na determinação do As. Esse problema pode estar relacionado com a formação de compostos voláteis oriundos da L-cisteína, tendo em vista que essa possui grupos tiol em sua estrutura e, uma vez que o S e o O são semelhantes, pode ocorrer alguma mudança na superfície do quartzo, inviabilizando a decomposição do hidreto.

Dessa forma, no presente trabalho, optou-se por utilizar uma mistura entre KI e ácido ascórbico para a pré-redução das espécies inorgânicas de As, uma vez que esses reagentes já se mostraram eficientes para tal finalidade.^{[38],[96]} Três diferentes concentrações dessa mistura foram avaliadas em relação à eficiência na geração de hidretos a partir do As(V), escolhendo-se a solução que continha 4% (m/v) de KI e 0.8% (m/v) de ácido ascórbico, em virtude da maior absorbância e precisão observadas. Com o intuito de diluir a solução da amostra o mínimo possível, para que se preservasse a sensibilidade, a solução KI/ácido ascórbico foi preparada em HCl 1,2 mol L⁻¹, em relação ao sobrenadante. Salienta-se que a redução do As somente ocorria se a mistura fosse preparada em HCl.

Escolhida a condição para a pré-redução do As(V), fazia-se necessário avaliar a influência exercida pela mistura redutora na geração dos hidretos das espécies inorgânicas de As. Como é evidenciado na Figura 9, a mistura KI/ácido ascórbico reduz efetivamente o As(V) a As(III), permitindo assim a determinação de ambas espécies, uma vez que a espécie pentavalente de As pode ser determinada por diferença, assumindo-se a ausência de MMA. No presente estudo utilizou-se, então, KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v) em HCl 1,2

mol L⁻¹, para determinar as espécies As(V) e As(III) nos alimentos derivados de arroz, nas mesmas condições empregadas para o As(III), que são HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v).

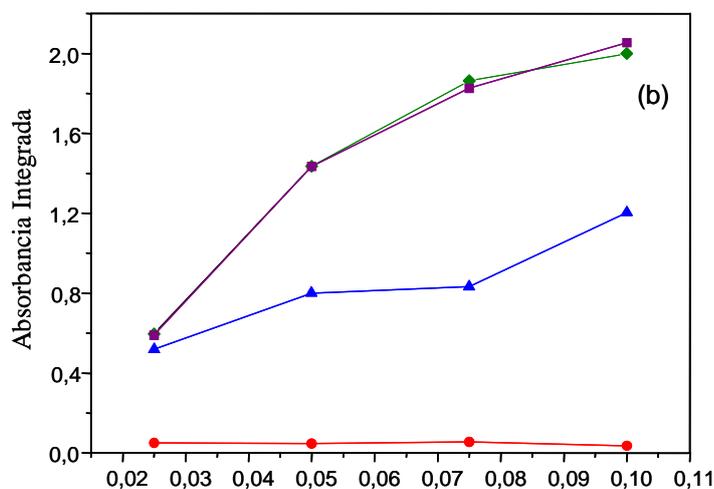


Figura 9. Influência da concentração de NaBH₄ nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, na concentração de 10 µg L⁻¹ para cada espécie, submetidas à etapa de pré-redução com KI (5% m/v) e ácido ascórbico (1% m/v) em HCl 1,2 mol L⁻¹. Condições utilizadas: HCl 10 mol L⁻¹. Adaptado de Cerveira^[90].

A Tabela VI resume as condições do método adaptado no presente estudo, para a determinação de As total, As(III) e As inorgânico em alimentos derivados de arroz.

Tabela VI. Condições do método de determinação de As total, As(III) e As inorgânico em alimentos derivados de arroz, por HG-AAS.

Variável	As (III) e As inorgânico	As Total
[HCl] (mol L ⁻¹)	10	6
NaBH ₄ , % (m/v)	0,1	0,5
Vazão do HCl e NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	4	4
Alça de amostragem (µL)	250	250
Vazão do gás de arraste (Ar) (mL min ⁻¹)	50	50
KI/ácido ascórbico, % (m/v)*	4/0,8	-

*solução em HCl 1,2 mol L⁻¹, empregada apenas na determinação de As inorgânico.

5.3 SENSIBILIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO

5.3.1 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito do método desenvolvido/adaptado para a determinação de As total e especiação química de As, em alimentos derivados do arroz, são apresentados nas Tabelas VII e VIII. Para calcular os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), em µg L⁻¹, foram utilizados os critérios de três e dez vezes o desvio padrão, (3s) e (10s), respectivamente, de dez medições consecutivas do analito no branco analítico. Esses valores foram aplicados nos cálculos do LD e do LQ do método, considerando-se a massa (g) de amostra e a diluição envolvida. No que tange às amostras líquidas, considerou-se os valores dos fatores de diluição de cada uma. A Tabela VII mostra os valores de LD e LQ encontrados para as amostras sólidas e a Tabela VIII para as amostras líquidas.

Tabela VII. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumental (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e do método (em ng g^{-1}) para as amostras sólidas e parâmetros da curva de calibração.

	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD (ng g^{-1})	LQ (ng g^{-1})	Parâmetros da curva de calibração		
					Eq. Regressão	r	FC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
As Total	0,17	0,52	6,8	21	$y = 0,07825x - 0,00533$	0,9990	1,0-8,0
As(III)	0,25	0,84	5,0	17	$y = 0,18466x + 0,00329$	0,9994	1,0-8,0
iAs	0,33	1,1	11	35	$y = 0,35928x + 0,02988$	0,9997	1,0-8,0

FC: Faixa de concentração; r: coeficiente de correlação

Tabela VIII. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para as amostras líquidas. O LD e o LQ instrumental são citados na Tabela VII.

Amostras	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)			LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	As total	As(III)	iAs*	As total	As(III)	iAs*
Bebidas lácteas	1,70	2,50	6,60	5,20	8,40	22
Vinho	0,68	1,00	1,30	1,04	1,68	4,40
Cerveja	0,85	1,25	3,30	2,60	4,20	11
Vinagre	0,34	0,50	2,64	2,08	3,36	8,80

Para calcular o LD e o LQ do As total, em ng g^{-1} , considerou-se 250 mg de amostra em um volume final de 10 mL de suspensão. Para o cálculo do LQ e LQ do As(III) e As inorgânico, considerou-se 250 mg de amostra em 5 mL e 4 mL de suspensão, respectivamente, sendo esse último ainda multiplicado por 2, correspondente ao fator de diluição.

5.3.2 Validação da exatidão do método

Usualmente, com o intuito de validar a exatidão do método desenvolvido para determinações analíticas, analisam-se materiais certificados com matriz similar à da amostra. Todavia, para os alimentos derivados de arroz analisados no presente trabalho não há material de referência que possibilite avaliar a exatidão do método, com exceção da farinha de arroz. Uma alternativa viável consiste na realização de testes de recuperação do analito, também conhecido como “*spike*”, em que se adiciona uma quantidade conhecida do analito a replicatas da amostra, a qual é em seguida analisada nas condições do método desenvolvido. Após, compara-se os resultados encontrados com os esperados, desejando-se obter recuperação próxima a 100%.

Para verificar a correta recuperação do As total nas amostras sólidas, adicionou-se um volume tal que se obtivesse $2 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito em cada replicata da amostra, preparada em triplicata, e realizou-se a extração, conforme o método já anteriormente descrito. Os valores para a amostra com sem adição de *spike* foram comparados, sendo os resultados encontrados listados na Tabela IX. Como é possível observar, a recuperação foi 100% ou próxima desse valor, indicando que não houve perdas do analito durante a execução do procedimento experimental ou efeitos de matriz.

Tabela IX. Recuperação do As total adicionado às amostras sólidas de alimentos à base de arroz, de forma a obter $2 \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento no extrato da amostra. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$).

Amostra	Presente na sol. da Amostra (ng g^{-1})	Após Adição de As (ng g^{-1})	Esperado (ng g^{-1})	R (%)
Mistura para Bolo	$52,6 \pm 4,9$	$136,9 \pm 7,7$	133,7	102
Bolacha com Orégano	$91,5 \pm 2,9$	$182,5 \pm 6,6$	171,0	107
Leite em pó	$14,7 \pm 0,2$	$94,5 \pm 1,6$	93,3	101
<i>Cookies</i>	$44,2 \pm 1,9$	$123,1 \pm 4,0$	122,7	100
Massa	$23,0 \pm 2,2$	$60,1 \pm 4,6$	62,4*	96

R: Recuperação; *: amostra enriquecida de modo a obter $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As no extrato.

Também foram realizados testes para verificar a recuperação de As(III) e As(V) nas amostras sólidas, adicionando-se um volume tal que se obtivesse $4 \mu\text{g L}^{-1}$ das espécies em cada triplicata das amostras. Realizou-se a extração e o tratamento das mesmas conforme o método já descrito, comparando-se os resultados obtidos para as amostras com e sem *spike*. Esses resultados são mostrados nas Tabelas X e XI, onde é possível observar boa e satisfatória recuperação do analito, com exceção do As(III) no leite em pó de arroz, onde a recuperação não foi quantitativa.. Acredita-se que esse resultado insatisfatório possa estar relacionado com a dificuldade de extração dessa amostra, que foi analisada diversas vezes, e as concentrações encontradas não foram precisas. Após a extração era possível notar a presença de partículas sólidas, que flutuavam no sobrenadante, sendo de difícil separação mesmo após a etapa de centrifugação, pois não decantavam como as demais partículas sólidas das outras amostras. Dessa forma, é possível que haja interferência de matriz e que o método experimental aqui empregado não seja aplicável para amostras como o leite em pó, devido à dificuldade de extração que foi observada, sendo necessários mais estudos acerca de matrizes similares.

Tabela X. Recuperação do As(III) adicionado às amostras sólidas de alimentos à base de arroz, de forma a obter $4 \mu\text{g L}^{-1}$ da espécie no extrato da amostra (n = 3).

Amostra	Presente na Amostra (ng g⁻¹)	Após Enriquecimento (ng g⁻¹)	Esperado (ng g⁻¹)	R (%)
Bolacha Integral	32,3 ± 3,2	106 ± 3	113	96
Bolacha Orgânica	62,4 ± 8,2	142 ± 1	144	99
Leite em Pó	9,4 ± 0,9	31,1 ± 8,1	89,5	35
<i>Cookie</i>	< LQ	67,6 ± 3,2	80,1	87
Massa	18,7 ± 2,4	90,9 ± 10,9	99,2	102
Bolacha	42,4 ± 2,6	127 ± 6	123	107
Mistura para Bolo	24,9 ± 1,8	109 ± 7	106	106
Bolo de Caneca	14,2 ± 1,5	85,7 ± 3,2	93,4	94
Arroz para <i>Sushi</i>	67,2 ± 1,1	153 ± 3	148	104

Tabela XI. Recuperação do As(V) adicionado às amostras sólidas à base de arroz, de forma a obter $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de As inorgânico no extrato obtido da amostra ($n = 3$).

Amostra	Presente na Amostra (ng g^{-1})*	Após Enriquecimento (ng g^{-1})	Esperado (ng g^{-1})	R (%)
Bolacha Integral	$47,8 \pm 9,0$	165 ± 6	177	95
Bolacha Orgânica	$96,2 \pm 11,9$	259 ± 8	227	117
Leite em Pó	$23,9 \pm 3,7$	126 ± 5	152	84
Cookie	$35,8 \pm 0,7$	124 ± 1	165	77
Massa	$35,9 \pm 5,6$	175 ± 8	165	107
Bolacha	$72,9 \pm 6,6$	184 ± 6	203	93
Mistura para Bolo	$32,7 \pm 1,7$	153 ± 6	161	95
Bolo de Caneca	$22,4 \pm 1,4$	134 ± 3	151	94
Arroz para Sushi	$52,2 \pm 1,2$	150 ± 2	181	102

* Determinado como As inorgânico

Para as amostras de farinha de arroz analisaram-se materiais de referência certificados (NIST 1568a e ERM BC211). Como pode ser observado na Tabela XII, as concentrações de As inorgânico e As total encontradas são concordantes com as certificadas. Além disso, de acordo com Cerveira^[90], a recuperação das espécies de As (III) e As(V) adicionado às amostras de arroz foram próximas a 100% que, juntamente à análise dos materiais de referência certificados, comprovam a exatidão do método.

Tabela XII. Resultados da análise dos materiais de referência de farinhas de arroz. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$).

	NIST 1568a		ERM BC211	
	Certificado (ng g^{-1})	Encontrado (ng g^{-1})	Certificado (ng g^{-1})	Encontrado (ng g^{-1})
As Inorgânico	-	-	124 ± 11	116 ± 3
As total	290 ± 30	270 ± 15	260 ± 13	257 ± 15

Quanto ao As total nas amostras líquidas, foram feitas adições de modo a se obter 1 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ do elemento em cada alíquota da amostra diluída, em triplicatas, diluindo-se cada uma conforme indicado na Tabela V. As concentrações encontradas são apresentados na Tabela XIII. Conclui-se que a exatidão do método empregado foi também satisfatória para as amostras líquidas, tendo em vista a recuperação próxima a 100%, sugerindo que não houve efeitos de matriz.

Tabela XIII. Recuperação do As total adicionado às amostras líquidas diluídas (n = 3).

Amostra	Presente na Sol. da Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)
Cerveja	1,3	2	3,82	116
Vinho	0,67	1	1,60	96
Vinagre	1,0	1	2,1	105
Bebida láctea sabor coco	1,8	2	3,8	100
Bebida láctea sabor avelã	2,5	2	4,5	100

Igualmente, visando avaliar a recuperação do As(III) nas amostras líquidas, adicionou-se a espécie de modo a se obter 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra diluída, em triplicatas, diluindo-se cada uma segundo informado na Tabela V. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela XIV, onde se observa que a recuperação do As(III) foi entre 93 e 112%, que pode ser considerada boa. A exceção foi o vinho de arroz, no qual a concentração da amostra ficou abaixo do LD instrumental, e a recuperação do As(III) adicionado foi muito baixa. A análise foi repetida, mas a recuperação do As(III) continuou no mesmo nível, revelando a interferência de matriz que possivelmente ocorre nesta determinação.

Tabela XIV. Recuperação do As(III) adicionado às amostras líquidas à base de arroz, de forma a obter $1 \mu\text{g L}^{-1}$ da espécie ($n = 3$).

Amostra	Presente na Sol. da Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)
Cerveja	$0,68 \pm 0,06$	$1,57 \pm 0,21$	1,68	93
Vinho	< LD	$0,36 \pm 0,03$	1,00	36
Vinagre	$0,49 \pm 0,18$	$1,56 \pm 0,22$	1,49	105
Bebida láctea sabor coco	$1,38 \pm 0,14$	$2,49 \pm 0,08$	2,38	105
Bebida láctea sabor avelã	$1,08 \pm 0,05$	$2,33 \pm 0,1$	2,08	112

5.4 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL

A Tabela XV mostra os resultados encontrados na determinação de As total nas amostras de alimentos derivados de arroz, com concentrações entre $20,3$ e 136 ng g^{-1} para as amostras sólidas e $1,35$ e $24,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras líquidas. A concentração média de As para as amostras sólidas foi $73,4 \text{ ng g}^{-1}$ e para as amostras líquidas foi $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela XV. Concentração de As total encontrada nas amostras de alimentos à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3).

Amostra	Concentração
	Arsênio Total (ng g ⁻¹)
Farinha de Arroz Branco	79,9 ± 2,1
Farinha de Arroz Integral 1	124 ± 9
Farinha de Arroz Integral 2	115 ± 6
Farinha de Arroz Integral Biodinâmico	56,8 ± 8,7
Leite em Pó de Arroz	35,8 ± 0,4
Mistura para Bolo	63,9 ± 8,4
Bolo de Caneca	56,4 ± 3,9
Massa Oriental	46,3 ± 1, 4
<i>Cookies</i>	90,0 ± 2,9
Creme de Arroz	20,3 ± 1,1
Arroz Integral Pré Cozido	57,6 ± 2,7
Bolacha de Arroz Integral	83,5 ± 2,2
Bolacha de Arroz Orgânico	120 ± 3
Bolacha de Arroz Orgânico	123 ± 7
Temperada com Orégano	
Arroz para Sushi	136 ± 2
Bebida Láctea Coco ^a	17,6 ± 3,5
Bebida Láctea Avelã ^a	24,6 ± 0,5
Vinagre de Arroz ^a	4,15 ± 1,42
Cerveja de Arroz ^a	6,51 ± 1,74
Vinho de Arroz ^a	1,35 ± 0,12

^aConcentrações em µg L⁻¹.

Conforme pode ser observado na Tabela XV, há grande variação da concentração de As total nas amostras analisadas, tendo em vista os diferentes tipos de arroz utilizados para a preparação de cada alimento, bem como os outros componentes presentes. As farinhas e as bolachas de arroz integral contêm mais As, no geral, quando comparadas ao restante dos

produtos. Isso pode ser explicado pela maior concentração desse elemento na casca do arroz, conhecido por arroz integral.^[16] O arroz do tipo polido branco para preparo de sushi tem uma concentração de As total que está de acordo com a encontrada em estudo anterior, para amostras de arroz com este tipo de beneficiamento.^[90]

As bolachas e as bebidas produzidas à base de arroz orgânico contêm mais As em sua composição, o que era inesperado, uma vez que alimentos orgânicos são cultivados em solos livres de insumos químicos. Todavia, isso demonstra que não apenas pesticidas e fertilizantes empregados no solo podem contribuir para a contaminação da planta de arroz, mas também o As presente no próprio solo onde o arroz é cultivado.^[53] Já o vinagre, a cerveja e o vinho, contêm pouco As, o que pode ser devido ao processo de fermentação e preparação dos mesmos. A concentração de As é mais alta nas bebidas lácteas e, dependendo do consumo, o indivíduo poderá contaminar-se com o As presente. Além disso, de acordo com a Tabela XIV, a concentração de As(III), espécie mais tóxica, está acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ nessas bebidas.

Para avaliar os resultados obtidos para As total em amostras líquidas, as mesmas foram analisadas por ICP-MS, pelo prof. Valderi Dressler, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Como é possível observar na Tabela XVI, ao fazer comparação entre os resultados, a concentração de As total determinada por ICP-MS nas bebidas lácteas e no vinagre foram bem próximas das encontradas no presente trabalho, determinadas por HG-AAS. Apenas para o vinho de arroz os resultados diferiram, mas pode ser observado que a imprecisão foi muito alta na determinação por ICP-MS, indicando possível interferência de matriz.

Tabela XVI. Concentrações para As total encontrada nas amostras líquidas à base de arroz analisadas por ICP-MS e HG-AAS. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$).

Amostra	As total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	ICP-MS	HG-AAS
Bebida láctea Coco	$19,0 \pm 0,15$	$17,6 \pm 3,5$
Bebida láctea Avelã	$28,2 \pm 1,52$	$24,6 \pm 0,5$
Vinho	$4,55 \pm 2,17$	$1,35 \pm 0,12$
Vinagre	$4,62 \pm 0,38$	$4,15 \pm 1,42$

Os resultados encontrados no presente estudo mostram-se similares a alguns outros já publicados sobre As total em produtos de arroz, com algumas variações, mas dentro da faixa de desvio padrão estimado.^{[12],[21],[25],[97]} Segundo a investigação conduzida por Munera-Picazo *et al.*^[12], nas amostras de farinha de arroz analisadas a concentração de As variou de 30,5 a 107 $\mu\text{g kg}^{-1}$; nas bebidas à base de arroz o As variou de 18,5 a 18,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valores condizentes com os encontrados no presente estudo. Sun *et al.*^[21], em seu estudo de determinação de As em uma série de alimentos à base de arroz consumidos pela população britânica, encontraram concentrações entre 140 a 280 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de As nas amostras sólidas e 10 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As nas amostras líquidas analisadas. Segundo os autores, as altas concentrações de As encontradas nas amostras sólidas refletem a grande presença desse elemento nos grãos de arroz, principalmente devido a sua região de origem. Já em relação às amostras líquidas, nas quais foram encontradas menores concentrações de As do que nas sólidas, os autores justificam que isso deve-se à diluição do produto obtido do arroz pela adição de água no processo de preparação desses produtos, como vinagres, óleos e leites de arroz. Em relação às bebidas à base de arroz, também conhecidas como leite de arroz, Meharg *et al.*^[25] citam concentrações de As total entre 10,2 e 33,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, com uma concentração média de 22 $\mu\text{g L}^{-1}$, que estão de acordo com os encontrados no presente estudo, cuja concentração média nessas bebidas foi 21,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.5 DETERMINAÇÃO DE As INORGÂNICO

Para a especiação química de As inorgânico nas amostras de alimentos sólidos à base de arroz analisadas no presente estudo, foram aplicados dois métodos; extração com aquecimento em banho-maria ou forno micro-ondas, obtendo-se resultados similares. A Tabela XVII apresenta as concentrações encontradas nas amostras sólidas, para As inorgânico, As(III) e As(V), esta obtida por diferença. Para facilitar a comparação, a concentração de As total é também mostrada na Tabela XVII. É possível observar a grande variação da concentração de As e respectivas espécies nas amostras analisadas, em razão dos diferentes tipos de arroz utilizados para a elaboração de cada alimento, bem como os outros componentes que se encontram presentes.

A concentração de As inorgânico nas amostras sólidas variou de 23,7 a 82,9 ng g^{-1} . Como já citado, de acordo com a FDA e a WHO, o limite máximo tolerável para As inorgânico em arroz é de 200 ng g^{-1} ^[55] e, uma vez que os produtos aqui estudados são

derivados do arroz, pode-se considerar que todas as concentrações determinadas encontram-se dentro do limite estabelecido. Em 2015, a União Europeia estabeleceu limites para As inorgânico em arroz e seus derivados, tais como: (a) 200 ng g⁻¹ em arroz branco polido; (b) 250 ng g⁻¹ em arroz parboilizado; (c) 300 ng g⁻¹ em bolachas e bolos de arroz, e (d) 100 ng g⁻¹ em alimentos à base de arroz para bebês e crianças.^[98] Contudo, como é evidenciado por Sun *et al.*^[21], a preocupação em torno da concentração de As inorgânico nesses alimentos é que, mesmo que contenham níveis de As dentro do permitido, a alta ingestão diária dos mesmos, especialmente por indivíduos celíacos ou com outras restrições alimentares, acabe por causar graves riscos à saúde dos mesmos, a longo prazo.

Tabela XVII. Concentração de As inorgânico, As(III), As(V) e As total, encontrada nas amostras sólidas de alimentos à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3).

Amostra	Concentração (ng g ⁻¹)			
	As Inorgânico	As(III)	As(V) ^a	As Total
Farinha de arroz Branco	54,3 ± 1,4	46,1 ± 0,8	8,2 ± 1,6	79,9 ± 2
Farinha de arroz Integral 1	75,1 ± 0,5	71,8 ± 6,1	3,3 ± 6,1	124 ± 9
Farinha de arroz Integral 2	82,9 ± 4,7	47,4 ± 5,1	35,5 ± 6,9	115 ± 6
Farinha integral biodinâmico	43,7 ± 1,2	21,7 ± 2,8	22,0 ± 3,0	56,8 ± 9
Leite em pó	29,8 ± 3,6	16,5 ± 7,2	13,3 ± 8,0	35,8 ± 0,4
Mistura para bolo	26,7 ± 0,3	25,6 ± 0,6	1,1 ± 0,7	63,9 ± 8
Bolo de caneca	30,8 ± 1,7	12,3 ± 0,3	18,5 ± 1,7	56,4 ± 4
Massa oriental	23,7 ± 6,9	16,0 ± 1,5	7,7 ± 7,0	46,3 ± 1
<i>Cookies</i>	30,3 ± 4,3	9,5 ± 0,6	20,8 ± 4,3	90,0 ± 3
Bolacha Integral	52,8 ± 3,3	37,7 ± 3,7	15,1 ± 5,0	83,5 ± 2
Bolacha orgânica	65,1 ± 3,4	52,7 ± 5,9	12,4 ± 6,9	120 ± 3
Bolacha orgânica com orégano	62,0 ± 7,6	47,1 ± 3,7	14,9 ± 8,4	123 ± 7
Arroz para sushi	77,6 ± 2,0	48,0 ± 4,4	29,6 ± 4,8	136 ± 2

^a: obtido por diferença entre o As inorgânico e o As(III).

As concentrações de As(III) encontradas nas amostras líquidas são citadas na Tabela XVIII. O As(V) não pôde ser determinado nas amostras líquidas devido à baixa concentração de As nessas amostras. Investigou-se a determinação do As inorgânico nessas amostras líquidas, seguindo o mesmo procedimento experimental utilizado para as sólidas. Todavia, não foi possível por estar abaixo do limite de quantificação. No vinho, inclusive, o As(III) não foi detectado. Sendo assim, não foi possível realizar a especificação química de As inorgânico nas amostras líquidas, por HG-AAS.

Tabela XVIII. Concentração de As(III) encontrada nas amostras líquidas à base de arroz analisadas. Os valores são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3).

Amostra	Concentração	
	As (III), $\mu\text{g L}^{-1}$ HG-AAS	As (III), $\mu\text{g L}^{-1}$ HPLC-ICP-MS
Bebida lactea sabor coco	11,4 \pm 0,4	11,84 \pm 0,16
Vinho	< LQ	-
Cerveja	2,55 \pm 0,30	-
Vinagre	1,24 \pm 0,24	-

O As(III) foi também determinado na bebida láctea sabor coco através da técnica de HPLC-ICP-MS, pelo Prof. Valderi Dressler, da UFSM, cujos resultados são também mostrados na Tabela XVIII. Nota-se, nessa Tabela, que foi encontrada a mesma concentração de As(III) por ICP-MS e por HG-AAS. Os resultados obtidos nesse estudo mostram-se de acordo a outros já publicados sobre especiação de As em alimentos derivados de arroz, ainda que com algumas variações dentro da faixa de desvio padrão estimado.^{[12],[21],[25]} Assim como reportado por Sun *et al.*^[21] e Meharg *et al.*,^[25] o As inorgânico predomina nesses alimentos, representando, na maioria dos casos, aproximadamente de 60% a 80% do conteúdo total de As. A faixa de concentração de As inorgânico encontrado por Meharg *et al.*^[25] em bebidas à base de arroz (leite) foi de 7,1 a 20,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, condizentes com os valores encontrados nas bebidas lácteas analisadas no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente estudo adaptou-se um método já desenvolvido e otimizado para a determinação de As total e análise de especiação química de As inorgânico em arroz por HG-AAS, baseado na geração seletiva de hidretos de As (III). Este método foi aqui adaptado para alimentos à base de arroz, representando amostras líquidas e sólidas.

A separação das espécies de interesse foi eficiente, confirmando que o método desenvolvido para a determinação de As inorgânico em arroz também pode ser aplicado a seus derivados. Os hidretos do As(III) são gerados seletivamente a partir de NaBH_4 0,1% (m/v) e HCl 10 mol L^{-1} . O As(V) é reduzido com KI e ácido ascórbico e então determinado como As(III), sendo depois sua concentração estimada a partir da diferença entre o As inorgânico (As(III) + As (V)) e As (III). Nas amostras líquidas determinou-se apenas o As(III) e o As total; devido ao LQ mais elevado, o método não se mostrou adequado para a determinação de As inorgânico nestas amostras.

Tendo-se em vista a inexistência de materiais de referência certificados para os produtos à base de arroz aqui analisados, fizeram-se testes de recuperação do analito para avaliar a exatidão do método. As recuperações mostraram-se satisfatórias, com valores próximos a 100%. Os limites de quantificação alcançados para as amostras sólidas (17 e 35 ng g^{-1} , para As(III) e para As(V), respectivamente) podem ser considerados adequados, indicando a viabilidade de quantificação dessas espécies nos alimentos derivados de arroz através da HG AAS.

A extração do As total presente nas amostras analisadas, mediante o emprego dos reagentes $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2% (m/v) e HNO_3 10% (v/v), juntamente com o aquecimento em banho-maria, possibilitou a correta determinação do As total. Os testes de recuperação do analito revelaram boa exatidão, com recuperações próximas a 100%. No caso das amostras líquidas, a diluição das mesmas com HNO_3 0.28 mol L^{-1} também possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios.

Como era esperado, a partir de dados já publicados, foram encontradas concentrações inferiores aos limites máximos permitidos para As inorgânico pela FDA/WHO e para As total pela ANVISA. Nos alimentos produzidos à base de arroz integral foram encontradas maiores concentrações de As total e As inorgânico, como já era aguardado, visto que a casca do arroz é a parte do grão que mais contém As.

Conclui-se que HG-AAS, mediante a geração seletiva de hidretos a partir do As (III), é adequada para a análise de especiação química de As inorgânico em alimentos derivados de

arroz, tais como, farinha, bolacha, misturas para bolo e outros. Assim, o método pode ser empregado para monitorar a qualidade desses alimentos com respeito ao As inorgânico, de modo a atender a legislação atual.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jain, C. K.; Ali, I. *Water Res.* **2000**, *34*, 4304–4312.
- [2] Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *72*, 373–395.
- [3] Huang, J.- H.; Ilgenb, G.; Fecher, P. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 800–802.
- [4] Batista, B. L.; Souza, J. M. O.; De Souza, S. S.; Jr, F. B. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *191*, 342–348.
- [5] Tyson, J. *ISRN Anal. Chem.* **2013**, *2013*, 24.
- [6] Narukawa, T.; Suzuki, T.; Inagaki, K.; Hioki, A. *Talanta* **2014**, *130*, 213–220.
- [7] Sommella, A.; Deacon, C.; Norton, G.; Pigna, M.; Violante, A.; Meharg, A. A. *Environ. Pollut.* **2013**, *181*, 38 - 43.
- [8] Schoof, R. A.; Yost, L. J.; Eickhoff, J.; Crecelius, E. A. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 839–846.
- [9] Meharg, A. A; Rahman, M. M. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *37*, 839.
- [10] Signes-Pastor, A. J.; Carey, M.; Meharg, A. A. *Food Chem.* **2016**, *191*, 128–134.
- [11] Meharg, A. A.; Sun, G.; Williams, P. N.; Adomako, E.; Deacon, C.; Zhu, Y.; Feldmann, J.; Raab, A. *Environ. Pollut.* **2008**, *152*, 746–749.
- [12] Munera-Picazo, S.; Burló, F.; Carbonell-Barrachina, A. A. *Food Addit. Contam. Part A* **2014**, *31*, 1358–1366.
- [13] Walter, M. Antioxidantes de Grãos de Arroz Com Pericarpo Marrom-Claro, Vermelho e Preto, UFSM, **2009**.
- [14] J. Polleti, Quantificação de Elementos-Traço Em Arroz, UFRGS, **2012**.
- [15] Souza, J. M. O.; Carneiro, M. F. H.; Carolina, A.; Paulelli, C.; Grotto, D.; Magalhães, A. M.; Batista, B. L. *Quim. Nov.* **2015**, *38*, 118–127.
- [16] Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *65*, 122–136.
- [17] Walter, M.; Marchezan, E.; de Avila, L. A. *Cienc. Rural* **2008**, *38*, 1184–1192.
- [18] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no2 de 06 de fevereiro de 2012.<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta>> Acessado em 24 de maio de 2016.
- [19] Ramos, T. J. F.; Goularte, J. L. L. XXXI Encontro Nac. Eng. Produção. Belo Horizonte, MG, Brasil. **2011**.
- [20] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto no 6.323 de 27 de dezembro de 2007.

- <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao> Acessado em 24 de maio de 2016.
- [21] Sun, G.; Williams, P. N.; Zhu, Y.; Deacon, C.; Carey, A.; Raab, Feldmann, J.; Meharg, A. A. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 473–475.
- [22] Sharma, V. K.; Sohn, M. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 743–759.
- [23] Ng, J. C.; Wang, J.; Shraim, A. *Chemosphere* **2003**, *52*, 1353–1359.
- [24] Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. *Talanta* **2002**, *58*, 201–235.
- [25] Meharg, A. A.; Deacon, C.; Campbell, R. C. J.; Carey, A.; Williams, P. N. *J. Environ. Monit.* **2008**, *10*, 428–431.
- [26] Signes-Pastor, A. J.; Deacon, C.; Jenkins, R. O.; Haris, P. I.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Meharg, A. A. *J. Environ. Monit.* **2009**, *325*, 9–14.
- [27] Handbook of the toxicology of metals. <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123694133>> Acessado em: 26 de maio de 2016.
- [28] Gontijo, B.; Bittencourt, F. *An Bras Dermatol.* **2005**, *80*, 81–86.
- [29] Kumaresan, M.; Riyazuddin, P. *Curr. Sci.* **2001**, *80*, 837–846.
- [30] Baroni, C. D. *Pathologica* **1997**, *23*, 475–480.
- [31] Breccia, M.; Lo-Coco, F. *Expert Opin. Pharmacother.* **2012**, *13*, 1031–1043.
- [32] Iland, H. J.; Seymour, J. F. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2013**, *14*, 170–184.
- [33] Zhu, H.; Hu, J.; Li, X.; Chen, L. *Br. J. Haematol.* **2015**, *171*, 277–292.
- [34] Luh, M.-D.; Baker, R. A.; Henley, D. E. *Sci. Total Environ.* **1973**, *2*, 1–12.
- [35] Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. *Talanta* **2002**, *58*, 201.
- [36] Fowler, B. A.; Jones, R. L. *Handb. Toxicol. Met.*, Burlington, **2007**, p. 367.
- [37] IARC. International agency for Research on Cancer. Arsenic and arsenic compounds. <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs>> Acessado em 27 de maio de 2016.
- [38] Barra, C. M.; Santelli, R. E.; Abrão, J. J.; Guardia, M. d. I. *Quim. Nov.* **2000**, *23*, 58.
- [39] WHO. World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds. <<http://www.who.int/ipcs/publications>> Acessado em 27 de maio de 2016.
- [40] ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles>> Acessado em 28 de maio de 2016.
- [41] Thomas, D. J.; Styblo, M.; Lin, S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *176*, 127–144.
- [42] Liang, L.; Lazoff, S.; Cfan, C.; Horvat, M.; Woods, J. *Talanta* **1998**, *47*, 569–583.
- [43] United State Environmental Protection Agency. Arsenic rule benefits analysis: a SAB

- review. <<http://www.epa.gov/sab/eco/008.pdf>> Acessado em: 28 de maio de 2016.
- [44] Aureliano, M.; Nolasco, P. A.; Silva, J. J. R. F. d.; Silva, J. A. L. d. *Quim. Nov.* **2012**, *35*, 1062–1068.
- [45] Tseng, C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *235*, 338–350.
- [46] DeSesso, J. M.; Jacobson, C. F.; Scialli, A. R.; Farr, C. H.; Holson, J. F. *Reprod. Toxicol.* **1998**, *12*, 385–433.
- [47] FDA. Food and Drug Administration. FDA proposes limit for inorganic arsenic in infant rice cereal. <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm493740.htm>> Acessado em: 17 de agosto de 2016.
- [48] Singh, R.; Singh, S.; Parihar, P.; Pratap, V. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *112*, 247–270.
- [49] Schoof, R A; Eickhoff, J; Yost, L. J. *Elsevier Sci.*, Amsterdam, **1999**, pp. 81–88.
- [50] Del Razo, L. M.; Garcia-Vargas, G. G.; Garcia-Salcedo, J.; Sanmiguel, M. F.; Rivera, M.; Hernandez, M. C.; Cebrian, M. E. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1423–1431.
- [51] ANVISA. Portaria no 685, de 27 de agosto de 1998. ‘Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos’ e seu anexo: ‘limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos’.
- [52] ANVISA. Resolução - RDC nº 42 de 29 de agosto de 2013. "Dispõe sobre o Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos."
- [53] Bhadha, J. H.; Vanweelden, M. T. *Int. J. Environ. e Agric. Res.* **2016**, *2*, 72–75.
- [54] Meharg, A. A. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 415.
- [55] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<http://www.fao.org/news/story/en/item/238802>> Acessado em: 25 de maio de 2016.
- [56] Carbonell-Barrachina, A. A.; Wu, X.; Ramírez-Gandolfo, A.; Norton, G. J.; Burló, F.; Deacon, C.; Meharg, A. A. *Environ. Pollut.* **2012**, *163*, 77–83.
- [57] Petursdottir, A.H.; Friedrich, N.; Musil, S.; Raab, A.; Gunnlaugsdottir, H.; Krupp, E.M.; Feldmann, J. *J. Anal. Method.* **2014**, *6*, 5392.
- [58] Kot, A.; Namiesn, J. *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 69–79.
- [59] Perobelli, R.; Renée, A. *Quim. Nov.* **2009**, *32*, 970–975.
- [60] Aposhian, H. V. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 693–697.

- [61] Li, W. H.; Wei, C.; Zhang, C.; Van Hulle, M.; Cornelis, R.; Zhang, X. R. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 1102–1110.
- [62] Heinrich-Ramn, R.; Mindt-Prüfert, S.; Szadkowski, D. J. *J. Chromatogr B* **2002**, *778*, 263–273.
- [63] Entwisle, J.; Hearn, R. *Spectrochim. Acta Part B* **2006**, *61*, 438–444.
- [64] Serafimovski, I.; Aradjova, I. B.; Stafilov, T.; Tsalev, D. L. *Microchem. J.* **2006**, *83*, 55–60.
- [65] Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *535*, 227–235.
- [66] Heitkemple, D.T.; Vela, N.P.; Stewart, K.R.; Westphal, C. S. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 299–306.
- [67] Lynch, H. N.; Greenberg, G. I.; Pollock, M. C.; Lewis, A. S. *Sci. Total Environ.* **2014**, *496*, 299–313.
- [68] Sadee, B.; Foulkes, M. E.; Hill, S. J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30*, 102.
- [69] Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Le, X. C. *Talanta* **2002**, *58*, 77–96.
- [70] Narukawa, T.; Inagaki, K.; Kuroiwa, T.; Chiba, K. *Talanta* **2008**, *77*, 427–432.
- [71] Huang, J.; Fecher, P.; Ilgen, J. Hu, K.; Yang, J. *Food Chem.* **2012**, *130*, 453–459.
- [72] Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C.; Kumar-Sengupta, M.; Ahamed, S. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **2007**, *42*, 1–11.
- [73] Van Loon, J. C.; Barefoot, R. R. *Analyst* **1992**, *117*, 563.
- [74] Le, X.C.; Cullen, W.R.; Reimer, K. J. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *285*, 227.
- [75] Howard, A.G.; Salou, C. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *333*, 89.
- [76] González, J. C.; Lavilla, I.; Bendicho, C. *Talanta* **2003**, *59*, 525.
- [77] Gonzalez, A.; Armenta, S.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M. *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 260.
- [78] Welz, B. *Atomic Absorption Spectrometry*, WileyVCH, **1985**.
- [79] D'ulivo, A. *Spectrochim. Acta Part B* **2010**, *65*, 360–375.
- [80] D'ulivo, A.; Dedina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E.; Wang, Q.; Welz, B. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1283–1340.
- [81] Dedina, J.; Tsalev, D. L. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Sons, England, **1995**.
- [82] Takase, I.; Pereira, H.B.; Luna, A.S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. d. *Quim. Nov.* **2002**, *25*, 1132.
- [83] Welz, V.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectroscopy*, WileyVCH, **1999**.

- [84] Farias, J; Milani, M; Niencheski, L; Paiva, M. *Quim. Nov.* **2012**, 35, 1401–1406.
- [85] Rüde, T. R.; Puchelt, H. *Anal. Chem.* **1994**, 350, 44–48.
- [86] Chen, B.; Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; Huang, J. *Anal. Methods* **2014**, 6, 7554–7558.
- [87] Musil, S.; Raab, A.; Krupp, E. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 993–999.
- [88] Cerveira, C.; Pozebon, D.; Moraes, D.P.; de Fraga, J. C. S. *Anal. Methods* **2015**, 7, 4528–4534.
- [89] Rasmussen, R. R.; Qian, Y.; Sloth, J. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 7851–7857.
- [90] Cerveira, C. Especificação Química de Arsênio Inorgânico Em Arroz Por Espectrometria de Absorção Atômica Com Geração de Hidretos (HG-AAS), UFRGS, **2015**.
- [91] de la Calle, M. B.; Emteborg, H.; Linsinger, T. P. J.; Montoro, R.; Sloth, J. J.; Rubio, R.; Baxter, M. J.; Feldmann, J.; Vermaercke, P.; Raber, G. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 641–651.
- [92] Agterdenbos, J.; Van Noort, J. P.M.; Peters, F.F.; Bax, D. *Spectrochim. Acta Part B.* **1986**, 41, 283.
- [93] Shraim, A.; Chiswell, B.; Olszowy, H. *Talanta.* **1999**, 50, 1109.
- [94] Lehmann, E.L.; Fostier, A.H.; Arruda, M. A. Z. *Talanta.* **2013**, 104, 187.
- [95] FDA. Food and Drug Administration. Analytical results from inorganic arsenic in rice and rice products sampling. <<http://www.fda.gov/downloads/>> Acessado em 15 de junho de 2016.
- [96] Matos Reyes, M. N.; Cervera, M. L.; Campos, R. C.; de la Guardia, M. *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, 62, 1078.
- [97] Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; Centrich, F.; Rubio, R.; López-Sánchez, J. F. *Food Chem.* **2014**, 147, 377–385.
- [98] Regulamentação EU 2015/1006. Máximos níveis permitidos para As inorgânico em alimentos. <<http://www.sgs.com/en/news/2015/07/safeguards-12015-eu-amends-maximum-levels-of-inorganic-arsenic-in-foodstuffs>> Acessado em 06 de outubro de 2016.