

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

ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ARROZ  
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM  
GERAÇÃO DE HIDRETOS E APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO

M. Sc. Camila Cerveira

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes  
Orientador

Prof. Dra. Dirce Pozebon  
Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2020.

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

CAMILA CERVEIRA

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ARROZ  
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM  
GERAÇÃO DE HIDRETOS E APRISIONAMENTO CRIOGÊNICO**

Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutora em Química

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes  
Orientador

Profa. Dra. Dirce Pozebon  
Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2020.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

Aos meus amados avós Adão Pentka (*in  
memorian*), Otília Pentka (*in memoriam*) e  
Almira Cerveira (*in memoriam*).

Dedico

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar a execução do presente trabalho.

Ao prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes, pela orientação, paciência, incentivo e suporte, sem os quais eu não teria dado estes muitos passos para chegar até aqui.

À profa. Dra. Dirce Pozebon pela co-orientação, ensinamentos, amizade e contribuição significativa durante minha trajetória acadêmica, desde a iniciação científica até a Pós-Graduação.

Ao prof. Dr. Jiří Dědina que, durante suas breves passagens à Universidade, disponibilizou gentilmente do seu tempo e contribuiu de forma significativa para este trabalho.

Aos Profs. Drs. Andrea P. de Oliveira (UFPR), Valderi L. Dressler (UFSM), Emilene M. Becker (UFRGS) e Juliana S. F. Pereira (UFRGS) pela participação na banca examinadora e pelas valiosas críticas e sugestões que contribuíram significativamente no aprimoramento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado.

Aos colegas do Núcleo de Química Analítica Aplicada (NUQA), pela amizade, auxílio e bom convívio diário. Em especial à Paolla, Nayara, Sheila e Matheus Camargo pela partilha da amizade, cafés, debates científicos e crises existenciais.

Ao colega Lucas Barnet (LFDA/RS) pela prestatividade e ajuda na análise por LC-ICP-MS.

Aos meus pais Eliane e César, por investirem em mim com todo o amor incondicional e por se doarem completamente em prol dos meus sonhos e formação. Ao Vinicius, meu amado irmão, pela paciência cotidiana.

Aos meus familiares (primos e tios) pela generosidade e por sempre me incentivarem. Sei que posso contar com vocês.

À memória dos meus amados avós Adão, Otília e Almira, pelo amor eternizado nas lembranças e na certeza de cumprir o legado que deixaram em meu coração.

Aos meus queridos amigos Luiza, Jéssica, Jucelaine, Camila Correa, Katherine e Leonardo, que de perto ou de longe, me abraçaram com companheirismo, apoio e descontração.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	3
<b>2.1 O arsênio</b> .....	3
<b>2.2 A presença de As no arroz</b> .....	6
<b>2.3 Análise de especiação química de As</b> .....	15
2.3.1 Métodos de extração das espécies de As.....	17
2.3.2 Separação e quantificação das espécies de As .....	22
<b>2.4 A geração de hidretos</b> .....	24
2.4.1 Mecanismo de formação de hidretos voláteis .....	25
2.4.2 Transporte dos hidretos voláteis.....	29
2.4.3 Processo de atomização em tubos de quartzo .....	29
<b>2.5 Análise de especiação química de As com geração de hidretos</b> .....	33
2.5.1 Análise de especiação química de As com HG-CT-AAS .....	36
<b>3. Objetivo</b> .....	42
<b>3.1 Objetivos específicos:</b> .....	42
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	43
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	43
<b>4.2 Reagentes e soluções</b> .....	44
4.2.1 <i>Limpeza do material</i> .....	45
<b>4.3 Amostras</b> .....	45
4.3.1 Preparo da amostra para a determinação de As total .....	45
4.3.2 Procedimento de extração para especiação química de As .....	46
<b>4.4 Sistema HG-AAS para determinação de As total</b> .....	49
<b>4.5. Sistema HG-CT-AAS para análise de especiação química de As</b> .....	50
4.5.1 <i>Separador gás-líquido</i> .....	52

4.5.2 Preparo do tubo para a etapa de aprisionamento criogênico.....	53
4.5.3 O aprisionamento criogênico e a determinação das espécies de As por HG-CT-AAS .....	54
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>57</b>
5.1 Otimização do sistema HG-CT-AAS semiautomatizado .....	57
5.1.1 Estudo da demanda de hidrogênio e oxigênio para a atomização da arsina AsH <sub>3</sub> .....	57
5.1.2 Aprisionamento e separação das espécies de As.....	66
5.1.3 Avaliação da precisão do método.....	72
5.2 Avaliação do procedimento de extração das espécies de As no arroz.....	74
5.3 Determinação de As total no arroz .....	77
5.4 Determinação das espécies de As no arroz.....	83
5.5 Concentrações das espécies de As no arroz de diferentes países .....	92
<b>5.6 Figuras de mérito.....</b>	<b>96</b>
5.6.1 Limites de detecção e de quantificação.....	96
5.6.2 Avaliação da exatidão do método .....	98
5.7 Estimativa da ingestão diária (EDI) da espécie iAs para avaliação do risco de exposição ao consumo do arroz.....	101
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>106</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>109</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural dos principais compostos de arsênio. ....	4
<b>Figura 2</b> Representação esquemática da possível absorção das espécies de As pela planta do arroz. Adapado de Kumarathilaka e colaboradores. <sup>47</sup> .....	9
<b>Figura 3.</b> Representação da morfologia do grão do arroz. Adaptado de Jackson e Punshon. <sup>54</sup> .....	10
<b>Figura 4.</b> Etapas envolvidas na análise de especiação química de As em arroz. ....	48
<b>Figura 5.</b> Representação do sistema utilizado para a determinação de As total por HG-AAS. Carreador: HCl (1 mol L <sup>-1</sup> ; vazão 4 mL min <sup>-1</sup> ); alça de amostragem: 250 µL; VI: válvula de injeção; a: ponto de confluência para adição do agente redutor: NaBH <sub>4</sub> 0,75% (m v <sup>-1</sup> ) + NaOH 0,01% (m v <sup>-1</sup> ) (vazão 4 mL min <sup>-1</sup> ); gás de arraste: argônio (50 mL min <sup>-1</sup> ). ....	49
<b>Figura 6.</b> Representação do sistema utilizado para a especiação química de As por HG-CT-AAS. Carreador: água (vazão 2 mL min <sup>-1</sup> ); alça de amostragem: 500 µL; VI: válvula de injeção; a: ponto de confluência para adição da solução tampão: Trizma (0,75 mol L <sup>-1</sup> a pH 6; vazão de 2 mL min <sup>-1</sup> ); b: ponto de confluência para adição do agente redutor: NaBH <sub>4</sub> 1% (m v <sup>-1</sup> ) + NaOH 0,01% (m v <sup>-1</sup> ) (vazão 2 mL min <sup>-1</sup> ); gás de arraste: mistura He+H <sub>2</sub> (99,7 mL min <sup>-1</sup> ); vazão de ar atmosférico: 24,4 mL min <sup>-1</sup> ; voltagem aplicada para aquecimento do tubo em “U”: 25 V. ....	51
<b>Figura 7.</b> Frasco de polietileno modificado para uso como separador gás-líquido na análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS. ....	52
<b>Figura 8.</b> Tubo em “U” utilizado para o aprisionamento criogênico na análise de especiação química de As por HG-CT-AAS. ....	54
<b>Figura 9.</b> Montagem do sistema utilizado para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS .....	56
<b>Figura 10.</b> Perfis dos sinais de absorvância do As a partir de uma solução contendo 2,5 ng de As(III), variando-se a composição do gás carreador e com adição de ar no atomizador.....	58
<b>Figura 11.</b> Variação da absorvância integrada do As em função da proporção H <sub>2</sub> :O <sub>2</sub> na composição do gás carreador a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III) (n=5).....	61



- Figura 12.** Perfis dos sinais de absorvância para uma solução de referência de 2,5 ng de As(III), (na cor preta) em diferentes proporções de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>: (A) 1,5; (B) 1,8; (C) 2,1; (D) 2,7; (E) 3,1; (F) 3,6; (G) 3,9; (H) 4,5; (I) 5,1; (J) 7,2. Os sinais de fundo estão representados pela cor vermelha. .... 62
- Figura 13.** Variação da absorvância integrada do As em função de diferentes proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III) adicionando oxigênio no MMQTA (n=5). .... 65
- Figura 14.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução de referência de 2,5 ng de As na forma de As(III), MMA, DMA e TMAOs (em preto) na presença de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>). O sinal de fundo está representado pela cor vermelha. .... 67
- Figura 15.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução de referência de 2,5 ng de As na forma de As(III), MMA, DMA e TMAOs (em preto) na presença de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>). (A) FIAS etapa 4 - 25 s, FIAS etapa 5 - 12 s; (B) FIAS etapa 4 - 20 s, FIAS etapa 5 - 17 s. O sinal de fundo obtido está representado em vermelho. .... 68
- Figura 16.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução padrão de referência de 2,5 ng de As na forma de TMAOs (em preto) na ausência de L-cisteína. O sinal de fundo obtido está representado em vermelho. .... 69
- Figura 17.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos para as soluções de referência individuais de 2,5 ng de As como As(III) (A), MMA (B) e DMA (C) (em preto), na presença de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>). O sinal de fundo obtido está representado em vermelho. .... 71
- Figura 18.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos a partir de cinco medidas consecutivas de uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de As(III), MMA e DMA na presença de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>) (A) e contendo 2,5 ng As na forma de TMAOs na ausência do pré-redutor (B). .... 73
- Figura 19.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos para as espécies de As presentes na amostra de arroz (em preto) e para o ensaio de recuperação das espécies de As (azul) mediante HG-CT-AAS (A) na presença e (B) na ausência de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>). O sinal de fundo obtido está representado em vermelho. .... 75
- Figura 20.** Concentração de As total, em ng g<sup>-1</sup>, entre as amostras classificadas por grupos de (A) arroz Branco (n=20), (B) arroz Integral (n=19) e (C) arroz

Gastronômico (n=14) e a comparação quanto ao limite máximo de As total preconizado pela legislação brasileira (300 ng g<sup>-1</sup>). Legenda: B, arroz Branco; PB, arroz Parboilizado Branco; OB, arroz Orgânico Branco; I, arroz Integral; PI, arroz Parboilizado Integral; OI, arroz Orgânico Integral; A, arroz Arbóreo; BA, arroz Basmati; J, arroz Jasmine; PR, arroz Preto; V, arroz Vermelho; S, arroz Selvagem, SS, arroz para Sushi. .... 82

**Figura 21.** Concentração média da espécie DMA encontrada nas amostras de arroz antes (A) e depois (B) da aplicação do teste estatístico de Grubbs. Legenda: B, arroz Branco; PB, arroz Parboilizado Branco; OB, arroz Orgânico Branco; I, arroz Integral; PI, arroz Parboilizado Integral; OI, arroz Orgânico Integral. .... 89

**Figura 22.** Correlações entre as concentrações de iAs vs As total nas amostras de arroz Branco (A) e arroz Integral (B) e concentrações de DMA vs As total no arroz Branco (C) e arroz Integral (D). .... 91

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Limites máximos de iAs permitidos pela ANVISA para alimentos infantis.	15
<b>Tabela 2.</b> Programa FIAS utilizado para análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS em sistema semiautomatizado .....	55
<b>Tabela 3.</b> Vazões dos gases utilizadas para a avaliação da proporção H <sub>2</sub> :O <sub>2</sub> sobre a sensibilidade do As(III).....	60
<b>Tabela 4.</b> Vazões dos gases utilizados e os resultados de absorvância integrada para a avaliação da proporção H <sub>2</sub> :O <sub>2</sub> de 3,9 sobre a sensibilidade do As(III) obtida a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III), utilizando oxigênio no MMQTA (n=5). .....	64
<b>Tabela 5.</b> Vazões dos gases utilizadas para a avaliação da proporção hidrogênio: oxigênio sobre a sensibilidade de uma solução contendo 2,5 ng de As(III) adicionando oxigênio no MMQTA.....	65
<b>Tabela 6.</b> Sensibilidades relativas, considerando a absorvância integrada do As(III) como sendo 100%, para as espécies MMA e DMA em uma solução de referência mista com 5 µg L <sup>-1</sup> de cada uma das espécies (em L-cisteína 2% (m v <sup>-1</sup> )), e TMAOs em uma solução de referência de 5 µg L <sup>-1</sup> dessa espécie (sem adição de L-cisteína) (n=5).....	70
<b>Tabela 7.</b> Estudo da precisão e repetitividade do método de especiação química de As por HG-CT-AAS realizado em cinco dias diferentes (n=25), usando uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de As(III), MMA e DMA na presença de L-cisteína 2% (m v <sup>-1</sup> ) e uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de TMAOs na ausência do pré-redutor.....	74
<b>Tabela 8.</b> Recuperações das espécies de As adicionadas a uma amostra de arroz anteriormente à etapa de extração. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).....	76
<b>Tabela 9.</b> Concentração de As total nas amostras de arroz mediante HG-AAS. Os resultados são reportados como a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3).....	77
<b>Tabela 10.</b> Resultados do teste de Grubbs (valores de G) para verificação de presença de amostras com valores outliers. ....	80

<b>Tabela 11.</b> Concentração das espécies de As encontradas nas amostras de arroz mediante HG-CT-AAS. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3). .....	84
<b>Tabela 12.</b> Comparação da concentração, em $\text{ng g}^{-1}$ , das espécies de As nas amostras de arroz de diferente países. ....	94
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros de mérito para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS e As total por HG-AAS em amostras de arroz. ....	96
<b>Tabela 14.</b> Comparação entre as concentrações de As total, em $\text{ng g}^{-1}$ , encontradas no arroz por HG-AAS após extração com a mistura $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e $\text{HNO}_3$ e por GF AAS após decomposição por MIC. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações (n = 3). ....	99
<b>Tabela 15.</b> Análise dos materiais de referência certificados submetidos à extração com $\text{HNO}_3$ $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ e determinação das espécies de As por HG-CT-AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3). ....	100
<b>Tabela 16.</b> Comparação entre as concentrações das espécies iAs, MMA e DMA, em $\text{ng g}^{-1}$ , encontradas no arroz por HG-CT-AAS e por LC-ICP-MS. ....	101
<b>Tabela 17.</b> Estimativa da ingestão diária (EDI) para a espécie iAs através do consumo das amostras de arroz analisadas. ....	103

## Lista de abreviaturas

**ANOVA** - Análise de variância, do inglês, “*Analysis of Variance*”.

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**As(III)** - Arsenito.

**As(V)** - Arsenato.

**AsB** - Arsenobetaína.

**AsC** - Arsenocolina.

**ATP** - Adenosina trifosfato, do inglês, “*Adenosine Triphosphate*”.

**ATSDR** – Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças, do inglês, “*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*”.

**BMDL** - Limite de confiança inferior, do inglês, “*Benchmark Dose Lower Confidence Limit*”.

**CE** - Eletroforese capilar, do inglês, “*Capillary Electrophoresis*”.

**CRM** – Material de referência certificado, do inglês, “*Certified Reference Material*”.

**CT** - Aprisionamento Criogênico, do inglês, “*Cryotrapping*”

**DMA** - Ácido dimetilarsínico.

**EDI** - Estimativa da ingestão diária, do inglês, “*Estimation of Dietary Intake*”.

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

**FDA** - Agência Americana para Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês, “*Food and Drug Administration*”.

**GF AAS** - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*”

**GC** - Cromatografia a gás, do inglês, “*Gas Chromatography*”.

**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*”.

**HG-AFS** - Geração de hidretos acoplada à fluorescência atômica, do inglês, “*Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry*”.

**HG-CT-AAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos e Aprisionamento Criogênico, do inglês, “*Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry*”.

**HG-CT-ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Geração de Hidretos e Aprisionamento Criogênico, do inglês, “*Hydride Generation-Cryotrapping- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”.

**HG-GF AAS** - Geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, “*Hydride Generation-Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*”.

**HG-ICP-MS** - Geração de hidretos acoplada à espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, “*Hydride Generation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”.

**HG-ICP-OES** - Geração de hidretos acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, do inglês, “*Hydride Generation-Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”.

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”.

**HPLC-ICP-MS** - Cromatografia Líquida 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*”.

**iAs** - As inorgânico total, As(III) + As(V).

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

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

**ICP-OES** - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, do inglês, “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”.

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”.

**JECFA** - Comitê de Especialistas para Aditivos e Contaminantes Alimentares da FAO e da OMS, do inglês, “*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*”.

**LC** - Cromatografia Líquida, do inglês, “*Liquid Chromatography*”.

**LC-ICP-MS** – Cromatografia a Líquido acoplada à Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, “*Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”.

**LOD** - Limite de detecção, do inglês, “*Limit of Detection*”.

**LOQ** - Limite de Quantificação, do inglês, “*Limit of Quantification*”.

**SFC** - Cromatografia de fluido supercrítico, do inglês, “*Supercritical Fluid Chromatography*”.

**MIC** - Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, “*Microwave-Induced Combustion*”.

**MMA** - Ácido monometilarsênico.

**MMQTA** - multiatomizador, atomização em tubo de quartzo com micro chamas, do inglês, “*Multiple Microflame Quartz Tube Atomizer*”.

**OMS** - Organização Mundial da Saúde.

**PTFE** - Politetrafluoretileno.

**QTA** - Atomizador em tubo de quartzo, do inglês, “*Quartz Tube Atomizer*”.

**TETRA** - Íon tetrametilarsênico.

**TFA** - Ácido trifluoroacético.

**TMAH** - Hidróxido de tetrametilamônio.

**TMA<sub>3</sub>O** - Óxido de Trimetilarsênio.

**UE** - União Européia.

## Resumo

O arsênio (As) é um dos elementos químicos mais tóxicos e com elevado potencial carcinogênico. Em alimentos, geralmente, pode ser encontrado nas formas de arsenito (As(III)), arsenato (As(V)), ácido monometilarsônico (MMA(V)), ácido dimetilarsínico (DMA(V)) e arsenobetaina (AsB). O As inorgânico (iAs (As(III)+As(V))) é a forma de As mais tóxica. Com isso, é de suma importância a análise de especiação química de As para a avaliação dos riscos associados à ingestão de alimentos contaminados. Nesse sentido, o presente trabalho teve como principais objetivos o desenvolvimento de um método de separação das espécies de As por geração de hidretos com aprisionamento criogênico (HG-CT) e detecção mediante a espectrometria de absorção atômica (AAS) e a sua posterior aplicação para a análise de especiação química de As em arroz. Para a geração de hidretos de As, Tris (hidroximetil)aminometano (Tris.HCl) 0,75 mol L<sup>-1</sup> em pH 6 e NaBH<sub>4</sub> a 1% (m v<sup>-1</sup>) foram utilizados. As condições para a separação de arsinas no tubo em U foram otimizadas e uma completa separação dos sinais para o iAs, MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O foi alcançada. Para a extração das espécies de As presentes no arroz foi empregado o HNO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup> com aquecimento a 95 °C por 90 minutos. O As total foi quantificado após extração com K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2% (m v<sup>-1</sup>) e HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) seguido pela detecção de As por HG-AAS. Para a análise de especiação química por HG-CT-AAS foram obtidos limites de quantificação de 7,83; 8,75; 5,41 e 4,75 ng g<sup>-1</sup> para iAs, MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O, respectivamente. A exatidão, avaliada através da análise de materiais de referência certificados de farinha de arroz (NIST 1568b, ERM CB211 e NMIJ 7532-a) apresentou recuperações quantitativas das espécies iAs, MMA e DMA (90-103%). Os resultados obtidos para a determinação de iAs, MMA e DMA em 60 amostras de arroz foram comparados com os resultados obtidos para a determinação de As total por HG-AAS. Adicionalmente, a determinação das espécies de As presentes no arroz foi feita por cromatografia a líquido (LC) acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os resultados obtidos por HG-AAS e LC-ICP-MS foram comparados, individualmente, com os resultados obtidos por HG-CT-AAS e não apresentaram diferença significativa (nível de confiança de 95%).

**Palavras-chave:** Arsênio, Análise de Especiação Química, HG-CT-AAS, Arroz.



## Abstract

Arsenic (As) is one of the most toxic chemical element with a high carcinogenic potential. Usually, in food, it can be found as arsenite (As (III)), arsenate (As (V)), methylarsonate (MMA (V)), dimethylarsinate (DMA (V)) and arsenobetaine (AsB). Inorganic As (iAs (As (III) + As (V))) is the most toxic form of As. In this sense, chemical speciation analysis is extremely important to evaluate the risks associated to As intake from contaminated food. In this way, a chemical speciation analysis of As in rice samples was performed using a hydride generation coupled to a cryotrapping (HG-CT) with subsequent detection by atomic absorption spectrometry (AAS). For selective generation of As hydrides, 0.75 mol L<sup>-1</sup> Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris.HCl) buffer (pH 6) and 1% (m v<sup>-1</sup>) NaBH<sub>4</sub> were used. The conditions for collection/separation of arsines in the cryotrapping were optimized and a complete separation of the signals from iAs, MMA, DMA and TMA<sub>2</sub>O was achieved. Arsenic species were extracted from rice using 0.28 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> and heating at 95 °C for 90 min. In addition, total As determination was performed after extraction with 2% (m v<sup>-1</sup>) K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> and 10% (v v<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> followed by the detection of As by HG-AAS. The limits of quantification obtained for iAs, MMA, DMA and TMA<sub>2</sub>O were 7.83, 8.75, 5.41 and 4.75 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The accuracy was evaluated by analysis of certified reference materials of rice flour (NIST 1568b, ERM CB211 and NMIJ 7532-a) and quantitative recoveries for iAs, MMA and DMA were obtained (90-103%). The results obtained for iAs, MMA and DMA in 60 rice samples were compared with those obtained for total As determination by HG-AAS. In addition, the determination of As species present in rice was performed by liquid chromatography (LC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). No significant difference (95% confidence level) was observed between the results obtained by HG-CT-AAS with those determined by HG-AAS and LC-ICP-MS.

**Keywords:** Arsenic, Speciation analysis, HG-CT-AAS, Rice

## 1. Introdução

O conhecimento da concentração total de um determinado elemento químico fornece informações limitadas uma vez que, diferentes espécies químicas podem ter diferente biodisponibilidade, mobilidade e impacto tanto ambiental quanto toxicológico. É sabido que as diferentes espécies químicas do arsênio (As) possuem diferentes graus de toxicidade. Compostos inorgânicos como o As(III) e As(V) são cerca de 100 vezes mais tóxicos que as formas orgânicas do elemento.<sup>1,2</sup> Embora o conhecimento da concentração total do As seja útil, a análise de especiação química é de fundamental importância para uma estimativa realista do risco toxicológico ou do comportamento das espécies químicas no ambiente.

Quando comparado a outros cereais, o grão de arroz possui concentrações mais elevadas de As devido à grande eficiência que a planta tem em absorver este elemento. Vários estudos relatam a presença de As na sua forma mais tóxica no arroz, o As inorgânico (iAs (As(III)+As(V))), representando um potencial risco para a saúde humana.<sup>3-7</sup> O arroz é classificado como um dos alimentos mais populares para alimentação humana a nível mundial. Portanto, é evidente a necessidade de maiores informações sobre a concentração das diferentes espécies de As no grão de arroz, no sentido de estabelecer valores de referência, garantindo assim o consumo seguro do alimento.

A análise de especiação química é hoje uma necessidade real e também um desafio para os químicos analíticos. A necessidade de preservar a integridade das espécies ao longo do processo analítico, desde a amostragem até a medição final, constitui a essência do desafio da análise de especiação química. Outro desafio é a sensibilidade, geralmente, requerida para identificação e quantificação de espécies químicas em concentrações extremamente baixas.<sup>8</sup>

Nas últimas décadas, os avanços obtidos na instrumentação analítica foram cruciais para o desenvolvimento de métodos de análise de especiação química. Uma variedade de técnicas de separação tem sido empregada em análises de especiação, incluindo cromatografia a gás (GC), cromatografia a líquido (LC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia de fluido supercrítico (SFC).<sup>9</sup> No entanto, a LC, mais precisamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) emergiu como uma das técnicas de separação mais populares para a análise de especiação química. Para o

estudo de especiação química de As em alimentos observa-se uma predominância da hifenação da HPLC às técnicas de plasma, principalmente ao espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).<sup>3-5,10-15</sup> O sistema HPLC-ICP-MS apresenta melhor sensibilidade, precisão, seletividade e melhores limites de detecção dentre as técnicas disponíveis para análise de especiação química de As. Contudo, apesar de ser eficiente para a separação e detecção das espécies químicas de As em alimentos, métodos envolvendo a HPLC-ICP-MS são de elevado custo operacional e não se encontram disponíveis na maioria dos laboratórios de química analítica. Apesar dos métodos cromatográficos hifenados contribuírem significativamente para a especiação de As, o desenvolvimento de métodos alternativos ainda são estimulados como uma proposta promissora mais acessível.

Uma alternativa para a análise de especiação química de As é o uso da espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e aprisionamento criogênico (HG-CT-AAS). Além de permitir a pré-concentração dos compostos voláteis, a etapa de aprisionamento criogênico permite a separação das espécies de As de acordo com seu ponto de ebulição e propriedades cromatográficas, efetuando a separação das mesmas para posterior atomização e detecção pela técnica de espectrometria de absorção atômica. Deve-se considerar também que a técnica HG-AAS ainda é a mais popular e preferida para a determinação de As em termos de simplicidade, sensibilidade, precisão, e custo operacional.

Neste contexto, no presente trabalho será discutido o desenvolvimento de método para a análise de especiação de As em arroz por HG-CT-AAS. Para isso, foram avaliados os principais parâmetros relacionados a geração, aprisionamento e atomização das espécies voláteis de As por HG-CT-AAS, bem como a extração quantitativa das espécies de As no grão de arroz. Após desenvolvido o método, a sua posterior aplicação foi feita para a análise de especiação química de As em arroz comercializado no Brasil. Diante da problemática exposta frente à necessidade de determinação das diferentes espécies de As em amostras de alimentos, este estudo tem como missão contribuir com um método alternativo ao HPLC-ICP-MS e, relativamente, de fácil adaptação em laboratório.

## 2. Revisão bibliográfica

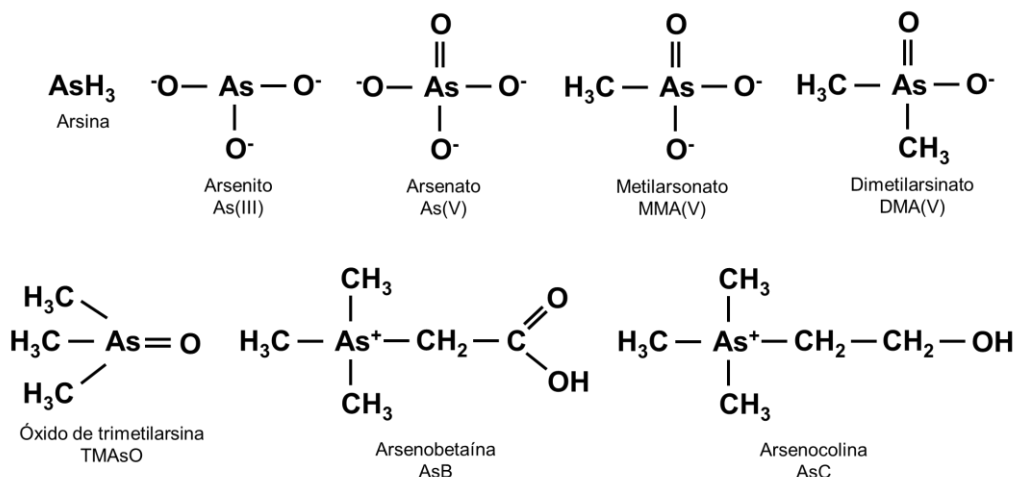
### 2.1 O arsênio

Onipresente na flora e fauna, o As é o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre e pode estar presente no ambiente oriundo de fontes naturais ou de fontes antropogênicas. Um exemplo de contaminação natural está associado ao processo de erosão de rochas e minerais, uma vez que existem mais de 200 espécies minerais que contêm o As em sua estrutura química.<sup>16</sup> Ainda, cerca de 60% do As liberado no meio ambiente é devido à atividade vulcânica.<sup>17</sup> No passado, compostos de As foram amplamente empregados na preservação de madeira, composição de tintas e na agricultura como herbicidas, formicidas e inseticidas. Visando um maior êxito na cadeia produtiva de frangos e suínos, o composto orgânico de As roxarsone (ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsênico) foi amplamente empregado como aditivo alimentar para garantir uma melhor pigmentação da carne, promover a aceleração no crescimento e eliminar os parasitas causadores de doenças.<sup>18</sup> Apesar do composto ser considerado benigno, após estudos demonstrarem que as condições anaeróbicas presentes no meio de criação de aves e suínos converte o roxarsone em As inorgânico (altamente tóxico), a sua comercialização foi suspensa na União Europeia em 1999 e na América do Norte em 2013.<sup>19,20</sup> Atualmente, compostos de As ainda são utilizados em medicamentos para tratamento contra leucemia promielocítica, na manufatura de materiais semicondutores e vidro.<sup>16,17,21</sup>

O As possui propriedades físico-químicas intermediárias entre metal e não metal, sendo referenciado como um metaloide. O elemento pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5), sendo os estados de oxidação III e V predominantes em condições redutoras e oxidantes, respectivamente.

O As pode se manifestar nas formas inorgânicas, como arsenito (As(III)) e arsenato (As(V)), e em uma variedade de compostos orgânicos, como as formas metiladas ácido monometilarsênico (MMA(V)), ácido dimetilarsínico (DMA(V)), arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), além de biocompostos derivados de arsenoacúcares e arseno-lipídeos. Do ponto de vista toxicológico, maior atenção é dirigida às espécies inorgânicas, por apresentarem um grau de toxicidade maior do que os

compostos orgânicos de As.<sup>1</sup> Na Figura 1 são apresentadas as fórmulas estruturais dos principais compostos de arsênio.



**Figura 1.** Fórmula estrutural dos principais compostos de arsênio.

Considerado um elemento tóxico, o As é associado a doenças e efeitos carcinogênicos.<sup>22</sup> O efeito toxicológico do As vai depender da forma química na qual o elemento se apresenta. A forma inorgânica é considerada a mais tóxica, sendo classificada pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* como uma substância do Grupo 1 – carcinogênico para seres humanos – e está associada ao desenvolvimento de câncer de pele, bexiga e rim, além de doenças cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso central.<sup>22,23</sup> Quando comparada a toxicidade entre as espécies, o As inorgânico é cerca de 100 vezes mais tóxico que o As orgânico. Ainda, no que diz respeito ao estado de oxidação, as espécies trivalentes são, aproximadamente, 60 vezes mais tóxicas que as espécies pentavalentes de As.<sup>24</sup> As espécies AsB, AsC, arseno-acúcares e arseno-lipídeos são consideradas formas não tóxicas do elemento ao organismo humano.

As propriedades toxicológicas dos compostos inorgânicos de arsênio em animais, se devem principalmente a espécie As(III), que é tiol-reativa. Sendo assim, o As(III) é capaz de inibir enzimas ou alterar o estado natural de proteínas por agirem com os grupos tióis provenientes de aminoácidos sulfurados, inibindo atividades biológicas. Ainda, devido a sua semelhança química com o fósforo, em uma competição

mimética, o As(V) pode agir como um desacoplador na fosforilação oxidativa mitocondrial, substituindo o grupo fosfato na formação de adenosina trifosfato (ATP). Já a forma mais tóxica, o gás arsina (AsH<sub>3</sub>), uma vez inalado, chega a corrente sanguínea apresentando mecanismo tóxico vinculado à ação direta em eritrócitos causando a hemólise.<sup>25</sup> Essa ação está ligada, aparentemente, a produção massiva de espécies de oxigênio e depleção de glutatona.<sup>26</sup>

Espécies metiladas de As como o MMA e o DMA são biodisponíveis no ambiente como metabólitos de vários microrganismos, como as bactérias *E. coli*, *Flavobacterium sp* e *Methanobacterium sp* e fungos como o *Aspergillus glaucus* que apresentam a capacidade de biometilar o As.<sup>27</sup> A biometilação trata-se de um mecanismo de redução da toxicidade, sendo que no corpo humano esse processo ocorre no fígado para reduzir a afinidade do composto com os tecidos do órgão, os quais podem então ser mais facilmente excretados pela urina.<sup>28</sup> Para indivíduos expostos às espécies inorgânicas de As, as principais formas encontradas na urina são DMA (60-80%), MMA (10-20%) e As(III) + As(V) (10-20%). Os compostos orgânicos AsB e AsC, encontrados em alimentos de origem marinha, não são biotransformados, sendo assim excretados de forma inalterada na urina.<sup>29</sup>

Os compostos de As são facilmente absorvidos, tanto oralmente quanto por inalação, sendo que a extensão dessa absorção depende das propriedades físico-químicas de cada espécie, principalmente a solubilidade e a volatilidade. Logo os efeitos tóxicos das espécies de arsênio são fortemente dependentes da sua forma química.

A exposição humana a elevados níveis de As ocorre principalmente por meio do consumo de água contaminada e alimentos. Dentre os alimentos que reconhecidamente possuem altos teores de As estão os alimentos de origem marinha como os peixes, crustáceos e outros frutos do mar que contêm, em geral, altas concentrações de AsB, AsC e arsenoaçúcares.<sup>6,30</sup> Um estudo realizado por Schoof e colaboradores<sup>6</sup>, envolvendo a análise de 40 alimentos presentes na cesta básica dos cidadãos norte-americanos, revelou que 90% dos produtos analisados contribuem para a ingestão de iAs (As(III) + As(V)). A concentração total de As foi maior nos frutos do mar, variando de 160 ng g<sup>-1</sup> em peixes de água doce e 2360 ng g<sup>-1</sup> em peixes oriundos de água salgada. A elevada concentração de As em peixes de água salgada encontrada pelos autores está relacionada à similaridade química entre a espécie AsB, espécie de As predominante em peixes e frutos do mar, e a glicina betaína. Peixes de origem marinha encontram-se em um ambiente com elevado teor de salinidade e, de forma a

contrabalancear a pressão osmótica dentro e fora da célula, a mesma absorve moléculas orgânicas carregadas. Como a AsB é quimicamente similar a glicina betaína, o transportador não consegue distinguir os dois íons, sendo então grande quantidade da espécie AsB absorvida para o interior da célula.<sup>31-33</sup> Em contraste, segundo observado por Schoof e colaboradores<sup>6</sup>, a concentração de iAs nas amostras de frutos do mar analisadas ficou na faixa de 0,5 ng g<sup>-1</sup> a 2,0 ng g<sup>-1</sup>. As maiores concentrações de As na forma inorgânica foram encontradas no arroz (73,7 ng g<sup>-1</sup>), seguido da farinha de trigo (10,9 ng g<sup>-1</sup>), suco de uva (9,2 ng g<sup>-1</sup>) e espinafre (6,1 ng g<sup>-1</sup>).

Dado o potencial tóxico desse elemento químico, a análise de especiação química vem sendo cada vez mais explorada, no sentido que sejam normatizadas as concentrações máximas referente a cada espécie de As nas mais variadas matrizes alimentares. Para tanto, necessita-se da evolução constante de métodos disponíveis para a separação e determinação dessas espécies, garantindo assim maior segurança alimentar.

## 2.2 A presença de As no arroz

Dentre os alimentos de origem terrestre, o arroz (*Oryza sativa*) é considerado um alimento básico presente na dieta de grande parte da população mundial. O seu cultivo é significativo, uma vez que possui elevado valor nutricional quando comparado a outros cereais. Considerado fonte de carboidratos, vitaminas, sais minerais, ferro, cálcio e fósforo, o arroz contribui com cerca de 20% da energia necessária através da ingestão diária de alimentos.<sup>34</sup>

Diferentemente dos outros cereais, o arroz pode ser cultivado em dois diferentes ecossistemas, de várzea e de terras altas. O ecossistema de várzea é caracterizado pela inundação contínua e controlada da lavoura durante o período de crescimento da planta. Por outro lado, o ecossistema de terras altas (sequeiro) é caracterizado pelo plantio em terreno drenado, que recebe água oriunda de precipitações pluviométricas ou de irrigação para o desenvolvimento da planta de arroz.<sup>35</sup> O ecossistema de várzea é o mais comum, sendo tradicionalmente empregado no Brasil e em países como China, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Tailândia, Estados Unidos, entre outros. No Brasil, o ecossistema de várzea é mais utilizado na Região Sul do Brasil, destacando-se o Rio Grande do Sul. Já o plantio de terras altas é concentrado na Região Centro-Oeste

(estados do Mato Grosso e Goiás), Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia).<sup>36</sup>

Após a colheita, o grão de arroz passa por diferentes processos de beneficiamento. Posteriormente à secagem do grão, com a remoção da camada protetora (a casca) é obtido o arroz integral, sendo constituído do farelo e endosperma do grão. Se após a remoção da casca o cereal também passar pelo processo de remoção do farelo, chamado de polimento do grão, o arroz branco polido será obtido. O grão do arroz também pode passar por processo hidrotérmico, onde ainda com a casca, o grão é submetido a um cozimento parcial para a obtenção do arroz parboilizado. Esse arroz parboilizado pode ser descascado, resultando no arroz parboilizado integral, ou ainda descascado e polido, obtendo-se o arroz parboilizado polido.<sup>36,37</sup>

Nos últimos anos um crescente interesse em relação ao estudo da contaminação de As na planta do arroz tem sido constatado através de inúmeras publicações.<sup>13</sup> Isso se deve ao fato que o arroz possui uma grande capacidade em acumular o As em seus grãos. Quando comparado a outros cereais, como o trigo e a cevada, a concentração de As no grão de arroz chega a ser 10 vezes superior.<sup>3,13</sup>

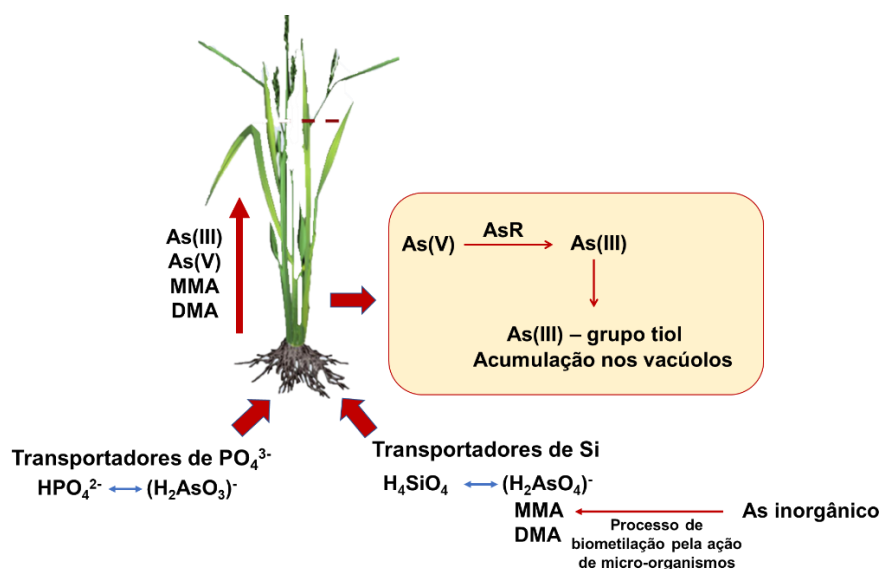
As principais fontes de As durante o cultivo do arroz são o solo e a água. A química do As nos arrozais é altamente complexa, uma vez que os ciclos redox do solo e a absorção do As durante o cultivo da planta são afetados por vários fatores como os processos da rizosfera, biodisponibilidade do As e o metabolismo da planta de arroz. Um fator considerado importante na biodisponibilidade e da absorção de As no arroz é o Fe presente no solo. Óxidos e hidróxidos de Fe presentes no solo são eficientes sorventes para o As, principalmente o As(V). As placas de óxidos e hidróxidos de Fe presentes na superfície da raiz do arroz adsorvem o As, impedindo a sua absorção pelas células da raiz. Contudo, em ambientes anaeróbicos (inundados, pobre em oxigênio), ocorre a dissolução redutiva dos óxidos e hidróxidos de Fe (redução do Fe(III) a Fe(II)), e o As é dessorvido, aumentando significativamente a sua biodisponibilidade na fração solúvel.<sup>38-40</sup> Outra hipótese que pode ocorrer é que o As(V) adsorvido pode ser reduzido a As(III) na fase sólida do solo e, uma vez que o As(III) possui menor afinidade em ser adsorvido pelos óxidos e hidróxidos de Fe, é liberado do solo para a água, levando a alta captação de As na planta e nos grãos do arroz.<sup>38-40</sup>

A fácil absorção do As pode também estar relacionada às próprias características da planta, uma vez que teores significativos de As também são encontrados no arroz sequeiro (ambiente aeróbico, rico em oxigênio).<sup>41,42</sup> A facilidade da planta do arroz em



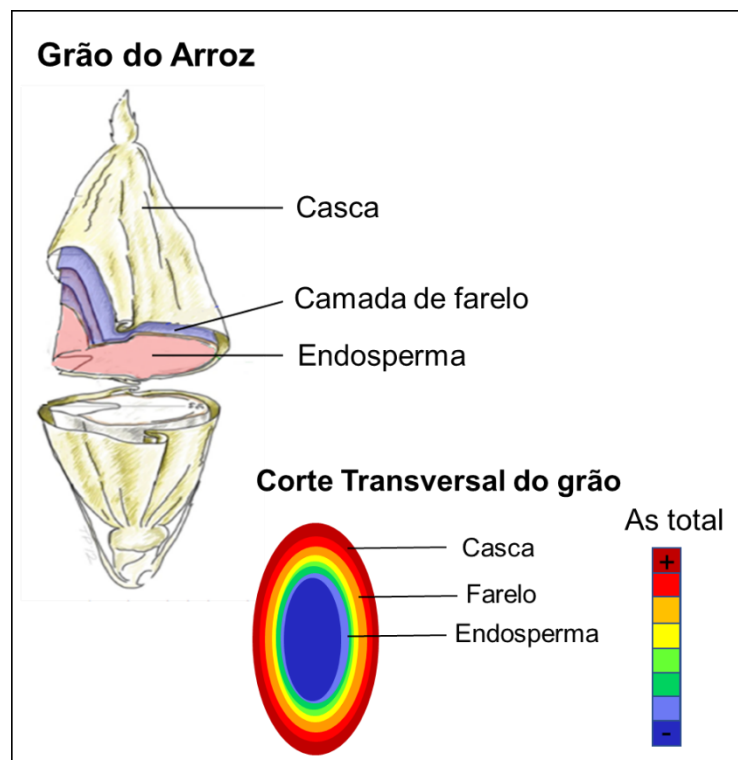
acumular o As, principalmente na forma inorgânica, pode estar relacionada à similaridade química entre o  $(\text{H}_2\text{AsO}_4)^-$  e  $(\text{H}_2\text{AsO}_3)^-$  com o ácido monossilícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) e hidrogenofosfato  $(\text{HPO}_4)^{-2}$ , respectivamente. Essa similaridade entre os compostos faz com que os transportadores de silicato e fosfato da planta não sejam capazes de diferenciá-los das espécies de As.<sup>43,44</sup> Além disso, o As tem grande afinidade pelos grupos tióis presentes na planta, denominados fitoquelatinas, o que leva à formação de complexos estáveis, auxiliando no acúmulo do contaminante. O acúmulo do elemento na planta causa o desacoplamento do fosfato na ATP e peroxidação lipídica, levando a reduções na germinação, crescimento e desenvolvimento de raízes e da parte aérea. Conseqüentemente, essas alterações podem resultar em um decréscimo na produtividade da cultura do arroz.<sup>40,45</sup>

Com relação às espécies MMA e DMA, o mecanismo de absorção dos compostos orgânicos de As ainda não é bem compreendido. As espécies MMA e DMA podem ser absorvidas pela planta, porém as suas taxas de absorção são muito mais lentas quando comparadas às das espécies inorgânicas.<sup>45,46</sup> Sugere-se que o MMA e DMA não dissociados são as principais espécies absorvidas pelas raízes do arroz por meio de transportadores de silicato.<sup>40</sup> Além deste mecanismo, há uma outra possibilidade pouco conhecida de absorção de MMA e DMA na forma dissociada, porém em uma cinética de absorção muito mais lenta que das moléculas não dissociadas.<sup>40</sup> A absorção de ambas as espécies, principalmente o MMA, é sensível ao pH do meio. A absorção diminui com o aumento do pH de 4,5 para 6,5, e essa tendência está amplamente alinhada à porcentagem decrescente de moléculas não dissociadas de MMA e DMA, sugerindo que moléculas não dissociadas são as principais espécies capturadas pelas raízes do arroz.<sup>40</sup> Na Figura 2 é esquematizado o possível processo de absorção das espécies de As pela planta do arroz.



**Figura 2** Representação esquemática da possível absorção das espécies de As pela planta do arroz. Adaptado de Kumarathilaka e colaboradores.<sup>47</sup>

A concentração de As no grão do arroz vai depender da variedade e do tipo de processamento ao qual o grão é submetido. Geralmente, uma maior concentração de As é encontrada em arroz do tipo integral. Estudos relatam que a casca do grão é a região em que ocorre o maior acúmulo de As, seguida do farelo.<sup>48-50</sup> Uma vez que o arroz integral consiste do farelo e do endosperma do grão, é esperado que este tipo de arroz possua maior concentração de As. De modo geral, o arroz branco polido contém menor concentração de As.<sup>14,51,52</sup> Nesse sentido, Sun e colaboradores<sup>53</sup> avaliaram as concentrações das espécies de As distribuídas nas diferentes partes do grão do arroz. Os autores observaram que as espécies inorgânicas de As se encontram em maior concentração na casca e no farelo, enquanto que o DMA se apresenta em maiores concentrações no endosperma do grão. Na Figura 3 é representada a morfologia do grão de arroz e a distribuição do As no mesmo.



**Figura 3.** Representação da morfologia do grão do arroz. Adaptado de Jackson e Punshon.<sup>54</sup>

Quando comparadas as espécies de As no grão do arroz, as espécies inorgânicas estão presentes em maior proporção, chegando a representar até 90% do teor de As total.<sup>2,5,13,14,48,52</sup> Já os compostos orgânicos de As no arroz estão presentes na forma de DMA e MMA, sendo este último presente em concentrações muito baixas e poucas vezes detectado.<sup>52,55</sup> Em estudo realizado pela *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>55</sup>, das 1300 amostras de arroz e produtos derivados analisados, em 97% dos casos a concentração de MMA detectada foi inferior a 13 ng g<sup>-1</sup>. Além disso, somente em 1% dos produtos analisados a concentração de MMA variou de 20 a 30 ng g<sup>-1</sup>. Em estudo realizado por Petursdottir e colaboradores<sup>52</sup>, das 32 amostras de arroz analisadas, oriundas de diferentes países, o MMA foi detectado em 13 delas, sendo a concentração máxima encontrada de 7,2 ng g<sup>-1</sup>.

Em estudo realizado por Batista e colaboradores<sup>4</sup> envolvendo amostras de arroz comercializado em diferentes regiões do Brasil, os teores de As total variaram de 108 a 428 ng g<sup>-1</sup>. Quatro espécies de arsênio foram detectadas, a saber, As(III), As(V), MMA e DMA, em teores percentuais de 40, 18, 3,7 e 39%, respectivamente. O estudo ainda revelou que as concentrações das espécies inorgânicas de As nas amostras de arroz

produzidas no estado do Rio Grande do Sul foram superiores as concentrações encontradas em amostras produzidas em outras regiões do país. Segura e colaboradores<sup>56</sup>, com o intuito de avaliar os teores de As em arroz cultivado de forma convencional ou de forma orgânica, selecionaram 56 amostras incluindo arroz polido, arroz polido orgânico, arroz integral e arroz integral orgânico cultivados no Brasil. Os resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas na concentração total de As no arroz polido orgânico ( $158 \pm 56,1 \text{ ng g}^{-1}$ ) vs. arroz polido ( $137 \pm 47 \text{ ng g}^{-1}$ ) e também no arroz integral orgânico ( $228 \pm 95 \text{ ng g}^{-1}$ ) vs. arroz integral ( $218 \pm 61 \text{ ng g}^{-1}$ ). No entanto, a concentração de iAs foi 45% superior no arroz polido orgânico ( $72,2 \pm 24,5 \text{ ng g}^{-1}$ ) do que no arroz polido convencional ( $53,2 \pm 21,6 \text{ ng g}^{-1}$ ), e 41% superior no arroz integral orgânico ( $128 \pm 44 \text{ ng g}^{-1}$ ) do que no arroz integral convencional ( $98,8 \pm 30,8 \text{ ng g}^{-1}$ ). Já para as concentrações das espécies orgânicas (DMA+MMA), os valores médios encontrados foram  $73,3 \pm 40,3$ ;  $77,0 \pm 28,1$ ;  $86,6 \pm 46,6$  e  $125 \pm 47 \text{ ng g}^{-1}$  para arroz polido orgânico, arroz polido convencional, arroz integral orgânico, arroz integral convencional, respectivamente. Ainda, comparando as concentrações das espécies de As, amostras de arroz integral apresentaram concentrações de iAs (As(III) + As(V)) e As orgânico superiores aos valores encontrados no arroz polido.

Concentrações equivalentes de As no arroz cultivado de forma tradicional e orgânico estão associadas as próprias características do solo utilizado para o plantio. Williams e colaboradores<sup>57</sup> observaram que o conteúdo de matéria orgânica dissolvida no solo favorece o aumento da biodisponibilidade do As, facilitando assim a absorção do mesmo pelo grão do arroz. Em estudo realizado por Quazi e colaboradores<sup>58</sup>, os autores observaram que o conteúdo de As no arroz é influenciado principalmente pelas propriedades físico-químicas do solo. Os autores observaram que o solo rico em matéria orgânica apresenta elevado teor de óxidos e hidróxidos de Fe. Como mencionado anteriormente, ambientes anaeróbicos favorecem a dissolução redutiva dos óxidos e hidróxidos de Fe, fazendo com que o As seja desorvido, aumentando significativamente a sua biodisponibilidade no solo e facilitando a absorção do mesmo pela planta. Com isso, os autores observaram que, mesmo utilizando um cultivo livre de pesticidas, o elevado teor de matéria orgânica presente no solo levou ao aumento da concentração de As no arroz. Com base nisso, podemos esperar maiores teores de As quando o arroz é cultivado organicamente, uma vez que para o cultivo de arroz orgânico são empregados compostos com elevado teor de matéria orgânica.<sup>59</sup>

Recentemente Kato e colaboradores<sup>15</sup> avaliaram as concentrações das espécies de As em arroz cultivado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. Maiores teores de As total foram encontrados nas amostras produzidas no Rio Grande do Sul cuja concentração média foi de  $235 \pm 157 \text{ ng g}^{-1}$ , seguida das amostras produzidas em Santa Catarina ( $157 \pm 108 \text{ ng g}^{-1}$ ). Por outro lado, o arroz oriundo do estado do Mato Grosso do Sul apresentou a menor concentração média de As total,  $3,5 \pm 1,8 \text{ ng g}^{-1}$ . Esses resultados possivelmente estão associados ao sistema de plantio baseado no cultivo de terras altas. A análise de especiação química de As nas amostras dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina revelou que o percentual de iAs presente representa de 27 a 89% do teor total de As. O teor médio de iAs foi de  $123 \pm 26 \text{ ng g}^{-1}$ , com concentrações variando de 68 a  $174 \text{ ng g}^{-1}$ . Com relação às espécies orgânicas de As, somente o DMA foi detectado, cuja concentração média foi de  $110 \pm 85 \text{ ng g}^{-1}$  (com concentrações variando de 10 a  $303 \text{ ng g}^{-1}$ ). Vale ressaltar que 80% das amostras analisadas ultrapassaram o limite máximo de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  de iAs estabelecido pela União Europeia (UE) para arroz destinado a produção de alimentos infantis.<sup>60</sup>

Dado que o arroz possui uma grande capacidade em absorver o As em sua estrutura, os produtos derivados deste cereal acabam por sua vez também contendo quantidades apreciáveis desse elemento em sua composição. Atualmente o arroz tem sido utilizado como uma alternativa ao uso do trigo em diversos produtos como biscoitos, barras de cereal, massas, farinhas, entre outros. O consumo de produtos derivados do arroz é maior por parte de crianças e indivíduos que sofrem de doença celíaca. Consequentemente, estes grupos da população tornam-se mais vulneráveis a ingestão de maiores quantidades de As. Estudos evidenciam a presença de As em produtos à base de arroz, tais como bolacha, leite, vinho, vinagre, cereais matinais e barras de cereal, sugerindo que todos os alimentos que possuam o arroz em sua composição possam vir a ser uma fonte adicional de exposição ao As.

Signes-Pastor e colaboradores<sup>61</sup> ressaltam uma grande preocupação no que diz respeito à exposição de bebês e crianças pelo As, uma vez que alimentos especiais à base de arroz como “papinhas”, biscoitos e cereais estão frequentemente presentes na alimentação de crianças com idade inferior a 3 anos. Os autores ainda destacam que produtos à base de arroz são também largamente utilizados na alimentação de jovens, uma vez que são alimentos com elevado valor nutritivo, potencial alergênico relativamente baixo, além de estarem facilmente disponíveis no mercado. Os autores

realizaram um estudo no qual selecionaram algumas amostras de “papinhas” para bebês, cereais e biscoitos à base de arroz comercializados no Reino Unido para posterior análise de especiação química de As. Com relação ao iAs, as concentrações encontradas nas amostras de “papinhas”, cereais e biscoito foram  $120 \pm 47 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $113 \pm 70 \text{ ng g}^{-1}$  e  $108 \pm 42 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. Já para as concentrações de DMA, os valores encontrados foram  $56 \pm 32 \text{ ng g}^{-1}$  nas “papinhas”,  $34 \pm 11 \text{ ng g}^{-1}$  nos cereais e  $24 \pm 9 \text{ ng g}^{-1}$  nos biscoitos. Os autores também compararam as concentrações de As determinadas nas amostras de derivados produzidos a partir de arroz orgânico ou de arroz cultivado de forma convencional. Os valores encontrados de iAs nas “papinhas” e biscoitos à base de arroz produzidos de forma convencional foram maiores que os valores encontrados para os alimentos produzidos à base de arroz orgânico.<sup>61</sup> Contudo, esses resultados encontrados por Signes-Pastor e colaboradores<sup>61</sup> estão em dissonância com os obtidos em outro estudo feito no arroz cultivado de forma orgânica e convencional e comercializados no Reino Unido. Menon e colaboradores<sup>62</sup> relataram a presença de maiores concentrações de iAs no arroz produzido de forma orgânica. Embora não se tenha detalhes da fonte ou quantidade de matéria orgânica adicionada durante o cultivo do arroz, a presença da mesma, como discutido anteriormente, pode desempenhar um papel significativo no aumento da mobilidade do As no solo e na sua absorção pela planta do arroz.

Com o intuito de avaliar se produtos à base de arroz representam fontes adicionais de exposição ao As, Sun e colaboradores<sup>5</sup> selecionaram 40 amostras variadas de biscoito, massa, barras de cereal, “amazake” (vinho doce fermentado à base de arroz), óleo, vinagre, entre outros. Preliminarmente, os autores determinaram a concentração de As total nesses alimentos. A análise de especiação química foi aplicada somente para aqueles alimentos com concentração de As total prejudicial para humanos. Segundo os autores, as espécies inorgânicas de As foram predominantes, correspondendo de 75 a 90% do teor total de As; o DMA correspondeu de 10 a 25% do teor total de As. Llorente-Mirandes e colaboradores<sup>63</sup> determinaram a concentração total de As em 8 produtos multicereais (alimentos os quais possuem uma mistura de diferentes cereais, incluindo o arroz) e pó para mingau composto apenas por arroz, todos comercializados na cidade de Barcelona, Espanha. As concentrações de As total nas amostras de multicereais variaram de 7,7 a  $36 \text{ ng g}^{-1}$  com um valor médio de  $18 \text{ ng g}^{-1}$ . Já a amostra de pó para mingau, a qual continha mais de 90% de arroz em sua composição, a concentração de As total foi de  $267 \text{ ng g}^{-1}$ , o que representa um aumento

na concentração de As em quinze vezes em relação aos produtos multicereais. Em recente estudo, Punshon e Jackson<sup>64</sup> compararam as concentrações de As obtidas em alimentos como massas e pães preparados a partir de arroz e trigo. A concentração média de As na farinha de arroz foi de 141 ng g<sup>-1</sup>, valor este dez vezes superior à concentração média de As na farinha obtida a partir do trigo (15 ng g<sup>-1</sup>). Ainda, os autores observaram que o iAs representava cerca de 63% do As total presente em todos os alimentos preparados à base de arroz.

Conforme a extensão da contaminação do arroz por As foi evidenciada e os resultados publicados, diversos países passaram a concentrar esforços no sentido de estabelecer um limite para a concentração máxima para as espécies de As no arroz e seus derivados. Essas medidas visam assegurar a saúde da população, uma vez que o arroz é parte fundamental da dieta da população mundial. Em 2015 a UE estabeleceu limites máximos de iAs em alimentos em quatro níveis, sendo esses: *(i)* 200 ng g<sup>-1</sup> para arroz polido e branco; *(ii)* 250 ng g<sup>-1</sup> para arroz parboilizado; *(iii)* 300 ng g<sup>-1</sup> para biscoito e bolinho de arroz; *(iv)* 100 ng g<sup>-1</sup> para o arroz destinado à produção de alimentos para lactantes e bebês.<sup>65</sup> Ainda, a FDA recomenda como limite máximo de iAs 100 ng g<sup>-1</sup> para alimentos infantis à base de arroz.<sup>60</sup> Atualmente no Brasil somente o As total é monitorado, sendo 300 ng g<sup>-1</sup> o limite máximo tolerável de As total no arroz estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).<sup>66</sup> Apesar de não existir uma legislação que defina os níveis máximos de iAs no arroz, em 2017 foi publicado pela ANVISA os limites máximos de iAs permitidos para alimentos infantis, os quais são apresentados na Tabela 1.<sup>67</sup>

**Tabela 1.** Limites máximos de iAs permitidos pela ANVISA para alimentos infantis.

<b>Categoria</b>	<b>Limite máximo permitido, ng g<sup>-1</sup></b>
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	150
Alimentos de transição para lactantes e crianças de primeira infância	150
Fórmulas infantis para lactantes	20
Fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância	20
Fórmulas infantis destinadas a necessidades dietoterápicas específicas	20
Fórmula pediátrica para nutrição enteral	20
Fórmulas de nutrientes apresentadas ou indicadas para recém-nascidos de alto risco	20
Outros alimentos especialmente formulados para lactantes e crianças de primeira infância	20

Informações a respeito das concentrações das espécies de As em arroz são necessárias para uma avaliação do risco de exposição ao As, além de estabelecer regulamentos para o conteúdo máximo legal das espécies químicas do elemento nesses alimentos. Nesse sentido é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação e quantificação dos compostos inorgânicos e orgânicos de As em alimentos que atendam aos valores regulatórios, visando um maior controle na qualidade e o impacto na saúde da população.

### **2.3 Análise de especiação química de As**

O conhecimento da concentração total de um dado elemento fornece informações limitadas para avaliar os danos ao meio ambiente ou à saúde, uma vez que diferentes espécies químicas podem ter diferente biodisponibilidade, mobilidade e impacto tanto ambiental quanto toxicológico. A importância da análise de especiação química de As é refletida no crescente número de publicações e nas legislações



recentemente impostas com base no limite de concentração para as espécies individuais de As. Com isso, o desenvolvimento de métodos que permitem a separação e detecção das espécies químicas de As em baixa concentração são requeridos.

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), espécie química é definida como a forma específica de um elemento químico quanto a sua composição isotópica, seu estado eletrônico ou de oxidação e/ou estrutura complexa ou molecular. A análise de especiação química constitui-se na atividade analítica de identificar e/ou quantificar uma ou mais espécies e a especiação química refere-se à distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema.<sup>68</sup> Ainda, quando não é possível determinar as concentrações das diferentes espécies químicas, que somam a concentração total de um elemento em uma dada matriz, o processo de fracionamento é aplicável. Este consiste em identificar várias classes das espécies elementares de acordo com propriedades físicas (como por exemplo tamanho, solubilidade) ou químicas (ligação, reatividade).<sup>69</sup>

A amostragem, o armazenamento e a manipulação da amostra são tarefas difíceis na análise de especiação química. Isso se deve ao fato que muitas espécies são termodinamicamente instáveis e o simples ato de coletar uma amostra e isolar a espécie de sua matriz podem alterá-la, de modo que a informação a respeito das espécies químicas seja então irreversivelmente perdida. Além da estabilidade termodinâmica, outro fator a ser levado em conta no desenvolvimento de um método para análise de especiação química é a inércia cinética das espécies.<sup>70</sup> A necessidade de preservar a integridade das espécies a serem medidas ao longo do processo analítico, desde a amostragem até a medição final, constitui a essência do desafio da análise de especiação química.

Outro desafio são as baixas concentrações das espécies, após o fracionamento ou extração, que necessitarão de detectores extremamente sensíveis e seletivos para serem por fim quantificadas.<sup>8</sup> Além disso, as espécies químicas podem estar ligadas à matrizes muito complexas, necessitando de um número maior de etapas no preparo de amostra, que podem comprometer a integridade da espécie de interesse.

As demandas pela análise de especiação química são crescentes, vindas das áreas ambiental, indústria alimentícia, biomédica e farmacêutica. Conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos precisos e seletivos para a determinação das diferentes espécies químicas, principalmente de As, é de extrema importância para uma estimativa realista do risco toxicológico ou do comportamento das mesmas no ambiente. A análise

de especiação é ainda uma necessidade real e também um desafio para os químicos analíticos.

### *2.3.1 Métodos de extração das espécies de As*

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de espécies químicas não é trivial. A grande maioria das amostras, principalmente alimentos, encontram-se no estado sólido e a maioria das técnicas analíticas de detecção faz uso de soluções para a introdução da amostra. Portanto, uma etapa prévia de preparo da amostra deve ser efetuada. A etapa de preparo de amostras deve levar em consideração o principal objetivo da análise, ou seja, a determinação quantitativa das diferentes espécies químicas. Nesse caso, uma extração branda deve ser efetuada na qual, um solvente é utilizado como meio extrator podendo ser empregada uma fonte de energia como o ultrassom, micro-ondas ou aquecimento convencional. Ainda, para que um método de extração seja considerado ideal, é desejável a total extração das espécies químicas sem que haja interconversão e que os meios extractores utilizados não interfiram na etapa posterior de identificação e/ou quantificação das espécies químicas. Dessa forma, o solvente extrator, a fonte de energia, o tempo e a temperatura são alguns dos principais parâmetros que devem ser considerados.

Vários extractores como água, mistura água:metanol, ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), ácido trifluoroacético (TFA) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) têm sido empregados em conjunto com a agitação mecânica, ultrassom, aquecimento convencional ou radiação micro-ondas para a extração das espécies de As em arroz.

A mistura água:metanol foi frequentemente empregada para extração das espécies de As no arroz. Isso se deve ao fato de o metanol garantir a integridade das espécies durante o procedimento de extração, além de ser um solvente facilmente removido através de evaporação.<sup>71-74</sup> Pizarro e colaboradores<sup>72</sup> estudaram o emprego de diferentes misturas: água, água:metanol 1:1, água:metanol 1:9 e TFA. A mistura contendo a amostra e solvente extrator foi mantida em aquecimento a 55 °C por 10 horas seguida de banho de ultrassom por 5 min e, posteriormente, a determinação por HPLC-ICP-MS. A avaliação da exatidão do método desenvolvido foi feita em relação à concentração de As total. Embora os autores tenham utilizado material de referência certificado (CRM) para avaliação da exatidão, não foi feita uma avaliação

relacionada à concentração de cada espécie de As. Extração superior a 95% foi obtida nas misturas avaliadas, contudo, devido à alta resolução cromatográfica das espécies, a mistura água:metanol 1:1 foi escolhida pelos autores. Os limites de detecção para as espécies As(III), As(V), MMA, DMA e AsB foram 2; 3; 6; 5 e 3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Contudo, apesar das recuperações quantitativas para o somatório das espécies de As encontradas no arroz, em comparação ao teor total de As presente na amostra, vale destacar que os autores levaram em consideração somente a eficiência de extração, não considerando a possibilidade de interconversão entre as espécies de As durante o processo de extração.

No sentido de diminuir o tempo de extração, Narukawa e colaboradores<sup>75</sup> também avaliaram o emprego de água e diferentes misturas de água:metanol para a extração das espécies de As em arroz, porém combinadas a agitação mecânica (25 °C por 2 horas), banho de ultrassom (50 °C por 1 hora), extração acelerada por solvente (10 MPa por 10 min) e extração assistida por radiação micro-ondas (80 °C por 30 min). Quando utilizada a agitação mecânica ou banho de ultrassom para as diferentes misturas água:metanol, os autores observaram uma extração de até 30% do As presente no arroz. Ainda, quando testado a mistura água:metanol 1:1 e aquecimento por 8 horas a 50 °C, seguido do banho de ultrassom por 1 hora, uma recuperação de apenas 50% do teor total de As foi obtida, diferentemente do resultado citado por Pizzaro e colaboradores<sup>72</sup> (cuja recuperação foi de 102%). A máxima eficiência de extração foi alcançada empregando água como solvente extrator e aquecimento assistido por radiação micro-ondas. No estudo também foi avaliada a influência da temperatura (40 a 120 °C) e do tempo de extração assistida por radiação micro-ondas (5 a 30 min). Uma redução dos teores de As foi observada com temperaturas superiores a 80 °C, bem como a conversão das espécies DMA e As(III) a As(V). Foi investigado o tempo de extração, de 5 a 30 min, na temperatura fixa de 80 °C e a eficiência de extração do As tornou-se constante, bem como a estabilidade das espécies de As, nos tempos entre 15 e 30 min. Apesar dos resultados obtidos indicarem uma possível diminuição no tempo de extração, os autores fixaram um total de 30 min para a extração quantitativa do As na amostra de arroz. Ainda, os autores realizaram testes de adição e recuperação do analito para as espécies As(III), As(V), MMA, DMA, óxido de trimetilarsina (TMA<sub>3</sub>O), AsB, AsC e íon tetrametilarsônico (TETRA), no qual verificaram a total integridade das espécies de As adicionadas.<sup>75</sup>

Soluções ácidas diluídas de TFA,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{HNO}_3$  também são empregadas para a extração das espécies de As em arroz e produtos derivados. O uso de TFA permite a hidrólise de carboidratos complexos e do amido presente no grão do arroz. Contudo, é observado na literatura que este tipo de extrator pode levar a redução parcial do As(V) a As(III), sendo então um extrator apropriado quando o objetivo é a determinação das espécies orgânicas e do iAs.<sup>12,46</sup>

Abedin e colaboradores<sup>46</sup> avaliaram o emprego de TFA combinado ao aquecimento a 100 °C por 6 horas para a extração das espécies de As em arroz. Os autores observaram que o uso de TFA permitiu uma eficiência de extração de 100% com uma redução parcial (cerca de 21%) do As(V) a As(III) durante o procedimento de extração. Com isso, os autores recomendam o uso de TFA na extração das espécies de As presente no arroz quando o objetivo é a determinação do iAs e as espécies orgânicas MMA e DMA.

No sentido de acelerar o procedimento de extração, Raber e colaboradores<sup>12</sup> avaliaram o TFA como solvente extrator em concentrações de 0,02 a 1 mol L<sup>-1</sup> em conjunto a radiação micro-ondas (95 °C por 60 min). Os autores observaram a máxima eficiência de extração com TFA 0,02 mol L<sup>-1</sup>. Ainda, uma vez que o emprego de TFA reduz parcialmente o As(V) a As(III), para evitar a determinação errônea das concentrações das espécies As(V) e As(III), os autores utilizaram  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% (v v<sup>-1</sup>) para a completa oxidação do As(III) a As(V), sendo assim determinada as espécies iAs, MMA e DMA em amostras de arroz, trigo e tecido muscular de peixe.

Sanz e colaboradores<sup>76</sup> avaliaram um procedimento alternativo para extração de As(III), As(V), MMA e DMA em amostras de arroz e posterior determinação por HPLC-ICP-MS. Foram avaliados como meio extrator água, metanol, mistura água:metanol, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e as enzimas  $\alpha$ -amilase e protease e como fonte de energia uma sonda ultrassônica (30% de amplitude). O emprego de solução de TMAH 1% (v v<sup>-1</sup>) foi a solução extratora mais satisfatória com eficiência de extração de 70%, aproximadamente, para o As total. No entanto, esta foi descartada pelos autores uma vez que a interconversão de As(III) a As(V) foi observada durante o processo de extração. Contudo, extração quantitativa das espécies As(III), As(V), MMA e DMA foi possível com o uso da mistura enzimática  $\alpha$ -amilase e protease junto a sonicação em um curto intervalo de tempo (3 min). O procedimento de extração otimizado se mostrou eficiente, reduzindo o tempo de extração e aumentando a frequência de análise.

Guzman Mar e colaboradores<sup>77</sup> também utilizaram a hidrólise enzimática para extração das espécies de As e Se de arroz e produtos derivados. A mistura das enzimas protease e  $\alpha$ -amilase utilizada juntamente com radiação micro-ondas (37 °C por 40 min) mostrou-se um método de extração simples e inovador para especiação simultânea das espécies de As e Se em arroz e produtos derivados sem interconversão entre as espécies. Uma das vantagens do método proposto foi o aumento do teor total de As e Se extraídos, em comparação com a extração com sonda ultrassônica, provavelmente devido ao aumento da clivagem de proteínas e estruturas complexas pela ação das micro-ondas. Ainda, o método também permitiu um controle adequado de temperatura, risco mínimo de contaminação e perda do analito (já que a reação ocorre em um sistema fechado). Recuperações quantitativas foram obtidas para as espécies de As (74-100%) e Se (70-90%), sendo que, As(III), As(V), DMA e selenometionina foram as espécies detectadas em arroz e seus derivados.

Apesar de serem encontrados trabalhos na literatura que ainda utilizem mistura água:metanol, TFA e enzimas, de modo geral nos últimos anos o uso de HNO<sub>3</sub> diluído é o preferido para a extração das espécies de As em arroz e produtos derivados.<sup>2,3,5,10,13,51,52,61,63</sup> Em trabalho realizado por Sommella e colaboradores<sup>3</sup>, HNO<sub>3</sub> 1% (v v<sup>-1</sup>) foi utilizado para a extração das espécies de As no arroz. As amostras foram mantidas em repouso com a solução ácida por um período de 12 horas (“*overnight*”). Após, a mistura foi então submetida à radiação micro-ondas a uma temperatura máxima de 95 °C por 30 min e as espécies de As presentes no arroz determinadas por HPLC-ICP-MS. Os autores verificaram a total integridade do iAs, MMA e DMA durante a extração. Em contrapartida ao método proposto por Sommella e colaboradores<sup>3</sup>, o trabalho realizado por Sun e colaboradores<sup>5</sup> sugere o uso de HNO<sub>3</sub> 1% (v v<sup>-1</sup>) associado à extração assistida por radiação micro-ondas (95 °C por 30 min) sem o período de repouso. Os autores observaram extração quantitativa das espécies de As presentes no arroz, mesmo reduzindo significativamente o tempo na etapa de preparo de amostras. Maher e colaboradores<sup>10</sup> utilizaram HNO<sub>3</sub> 2% (v v<sup>-1</sup>) combinado à extração assistida por radiação micro-ondas (95 °C por 10 min) para a posterior determinação das espécies de As presentes em diferentes materiais de referência certificados por HPLC-ICP-MS. Os autores verificaram que o emprego de HNO<sub>3</sub> 2% (v v<sup>-1</sup>) garantiu uma recuperação quantitativa dos analitos sem a interconversão das espécies orgânicas MMA e DMA em iAs.

Em outros trabalhos, a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  combinada com o uso de  $\text{HNO}_3$  e aquecimento assistido por radiação micro-ondas também foi sugerida para extração das espécies de As em arroz. Llorente-Mirandes e colaboradores<sup>63</sup> utilizaram  $\text{HNO}_3$  0,2% (v v<sup>-1</sup>) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% (v v<sup>-1</sup>) combinada à radiação micro-ondas (95 °C por 45 min) para posterior determinação das espécies de As em arroz e produtos derivados por LC-ICP-MS. O método garantiu uma recuperação quantitativa dos analitos sem interconversão das espécies MMA e DMA em iAs. Com o objetivo de extrair e determinar as espécies de As presentes no arroz por geração de hidretos combinada à ICP-MS (HG-ICP-MS), Pétursdóttir e colaboradores<sup>52</sup> utilizaram  $\text{HNO}_3$  1% (v v<sup>-1</sup>) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% (v v<sup>-1</sup>) como solução extratora e aquecimento assistido por radiação micro-ondas (5 min 50 °C; 5 min 75 °C; 10 min 95 °C). A extração foi aplicada para diferentes variedades de amostras de arroz e materiais de referência certificados no qual os valores encontrados foram concordantes com os valores certificados.

Narukawa e colaboradores<sup>11</sup> avaliaram a eficiência de diferentes soluções de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HBr}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HCOOH}$ , TMAH e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  para extração e determinação das espécies de As em arroz por HPLC-ICP-MS. Os autores observaram que em meio fortemente ácido a redução de As(V) a As(III) foi favorecida e, em condições neutras, o As(III) não é eficientemente extraído da matriz. Além disso, os autores observaram a integridade da espécie DMA frente às diferentes soluções avaliadas. Os autores concluíram que o emprego de  $\text{HClO}_4$  0,05 mol L<sup>-1</sup> ou  $\text{HNO}_3$  0,15 mol L<sup>-1</sup> em presença de 46,4 μmol de Ag (adicionada para evitar redução de As(V) a As(III)) permitiu a extração quantitativa das espécies de As no arroz, mantendo a integridade de todas as espécies.

Em trabalho realizado por Huang e colaboradores<sup>2</sup>, diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3$  foram avaliadas para a extração e posterior quantificação das espécies de As presentes no grão de arroz utilizando a HPLC-ICP-MS. Os autores observaram uma estreita faixa de concentração de  $\text{HNO}_3$  para a preservação das espécies inorgânicas. O uso de concentração de  $\text{HNO}_3$  inferior a 0,28 mol L<sup>-1</sup> e aquecimento levou à significativa redução do As(V) a As(III) durante o processo de extração. Ainda, em concentração de  $\text{HNO}_3$  superior a 0,70 mol L<sup>-1</sup>, oxidação significativa do As(III) a As(V) foi observada. As espécies orgânicas MMA e DMA não sofreram alteração em toda a faixa de concentração de  $\text{HNO}_3$  avaliada. Com isso, os autores propuseram o uso de  $\text{HNO}_3$  0,28 mol L<sup>-1</sup> com aquecimento a 95 °C por 90 min como um método simples e eficiente, garantindo a total integridade das espécies de As. O método de extração

desenvolvido pelos autores passou a ser recomendado pela FDA para extração de espécies de As presentes em arroz e posterior determinação por HPLC-ICP-MS a partir do ano de 2012.<sup>78</sup>

Tendo em vista a diversidade de métodos presentes na literatura para a extração das espécies de As em arroz e produtos derivados, pode-se dizer que há um consenso entre os autores sobre o uso de HNO<sub>3</sub> diluído. Apesar do avanço obtido, ainda são necessários o desenvolvimento e a implementação de métodos analíticos de extração simples e rápidos que viabilizem a especiação química de As em arroz e seus derivados.

### *2.3.2 Separação e quantificação das espécies de As*

Nas últimas décadas, os avanços obtidos na instrumentação analítica foram cruciais para o desenvolvimento de métodos de análise de especiação química. A determinação quantitativa das diferentes espécies químicas requer a prévia separação das mesmas e um sistema de detecção suficientemente sensível. Uma variedade de técnicas de separação tem sido empregada em análises de especiação, incluindo cromatografia a gás (GC), cromatografia a líquido (LC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia de fluido supercrítico (SFC).<sup>9</sup> Embora a CE tenha alta eficiência de separação e recentes aplicações, a técnica é empregada com menor frequência para análise de especiação química.<sup>79-82</sup> Um dos principais motivos é o pequeno volume de injeção de amostra, tipicamente nanolitros, o que pode levar a uma amostragem não representativa, além da técnica apresentar LODs não satisfatórios para a determinação de espécies químicas em baixas concentrações.<sup>9</sup>

A cromatografia a líquido emergiu como uma das técnicas de separação mais populares para a análise de especiação química. Cromatografia a líquido é o termo geral dado às separações cromatográficas com uma fase móvel líquida, mas a maioria das separações de LC realizadas atualmente fazem parte de um subconjunto de LC conhecido como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A LC tem várias vantagens que a tornam uma opção atraente para análises de especiação. Ao contrário do GC, a LC é capaz de separar compostos não voláteis, bem como aqueles que se decompõem a temperaturas elevadas. A LC é uma técnica extremamente versátil, pois, tanto a fase estacionária quanto a fase móvel podem ser alteradas para atingir a separação desejada, além de uma enorme variedade de fases estacionárias estarem

disponíveis comercialmente.<sup>69</sup> Ainda, os sistemas de LC são facilmente conectados a técnicas de espectrometria atômica capazes de detectar as espécies em baixas concentrações.

Nos estudos de especiação química de As em arroz e produtos derivados observa-se uma predominância da hifenação da HPLC às técnicas de plasma, principalmente ao espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).<sup>3-5,10-15</sup> O sistema HPLC-ICP-MS apresenta melhor sensibilidade, precisão, seletividade e melhores limites de detecção dentre as técnicas disponíveis para análise de especiação química de As.

O trabalho de Huang e colaboradores<sup>2</sup> mostrou que a hifenação da HPLC-ICP-MS é eficaz para a separação e quantificação das espécies de As em diferentes variedades de arroz. Após o procedimento de extração, foi possível detectar as espécies As(III), As(V) e DMA nas amostras selecionadas para o estudo. Os baixos limites de detecção obtidos, de 1,3 ng g<sup>-1</sup> para as espécies As(III), As(V), MMA e DMA, permitiram a determinação dessas espécies em baixas concentrações. Ainda, recuperações quantitativas foram obtidas para os analitos adicionados: As(III) (101-105%), As(V) (95-97%), MMA (96-101%) e DMA (97-100%), bem como para a análise de materiais de referência certificados (85-98%). A separação e detecção das espécies de As foi possível em amostras de arroz, trigo e tecido muscular de peixe utilizando a HPLC-ICP-MS.<sup>12</sup> Segundo Raber e colaboradores<sup>12</sup>, limites de detecção adequados para análise de especiação química de As em alimentos foram obtidos: 1,0; 0,5 e 0,5 ng g<sup>-1</sup> para iAs, MMA e DMA, respectivamente. O emprego da HPLC-ICP-MS também permitiu a Llorentz e colaboradores<sup>63</sup> a obtenção de baixos limites de detecção (3 ng g<sup>-1</sup> para iAs e DMA e 6 ng g<sup>-1</sup> para MMA) para a detecção dos compostos de As em arroz e produtos derivados. Kato e colaboradores<sup>15</sup> também utilizaram a hifenação HPLC-ICP-MS para a separação e determinação dos compostos de As em 24 amostras de arroz. Após procedimento de extração, foi possível a separação dos compostos iAs, MMA e DMA. Limites de detecção de 1,1; 0,1 e 0,9 ng g<sup>-1</sup> foram obtidos para iAs, MMA e DMA, respectivamente.

Atualmente, o método de referência da FDA para análise de especiação química de As no arroz envolve o emprego da HPLC-ICP-MS para a separação e detecção das espécies.<sup>78</sup> Apesar de ser eficiente para a separação e detecção das espécies químicas de As em alimentos, métodos envolvendo a HPLC-ICP-MS são de elevado custo operacional, exigem grande experiência e conhecimento do analista e não se encontram



disponíveis na maioria dos laboratórios de química analítica. Apesar dos métodos cromatográficos hifenados contribuírem significativamente para aprimorar o estudo de especiação química de As, o desenvolvimento de métodos não-cromatográficos ainda são estimulados como uma proposta promissora mais acessível. Nesse sentido é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos de menor custo e que possam ser adaptáveis na maioria dos laboratórios de química analítica para a identificação e quantificação dos compostos inorgânicos e orgânicos de As, de forma que atenda e possa subsidiar as políticas de controle de contaminantes inorgânicos em alimentos.

## 2.4 A geração de hidretos

A propriedade que alguns elementos químicos como As, Se, Sb, Sn, Ge, Pb, Bi e Te apresentam em formar hidretos voláteis à temperatura ambiente, possibilitou o desenvolvimento da técnica de geração de hidretos, principalmente associada à espectrometria atômica.

A geração de hidretos (HG) envolve a conversão do analito presente na amostra líquida em um composto volátil através de uma reação com um agente redutor. Após a separação do hidreto volátil da fase líquida por ação de um separador gás-líquido, a fase vapor é transferida com o auxílio de um gás carreador para o atomizador, sendo posteriormente detectado. A derivatização por HG e a subsequente introdução do analito em fase gasosa é o método ainda mais utilizado para determinação de As por espectrometria de absorção atômica (HG-AAS). Isso se deve à relativa simplicidade, baixo custo operacional e suficiente sensibilidade. No sentido de aproximar os dados da literatura com a proposta do presente trabalho, os aspectos discutidos na revisão da literatura serão relativos ao acoplamento da HG com a AAS.

Nos primeiros trabalhos envolvendo a técnica de HG, sistemas contendo metais em solução ácida eram empregados para a redução e formação de compostos voláteis. Entretanto, o emprego de redutores metálicos (como Zn, Al ou Mg) era restrito a geração de hidretos de poucos elementos, basicamente  $\text{AsH}_3$  e  $\text{SeH}_2$ , o que restringia o uso da técnica. Além disso, problemas de reprodutibilidade, de valores altos de brancos analíticos (devido à baixa pureza dos metais) e perda de sensibilidade eram relatados.<sup>83</sup>

Contudo, algumas destas limitações foram minimizadas com o emprego de sais de tetrahidroborato como agente redutor. Comumente, é empregado o tetrahidroborato

de sódio (NaBH<sub>4</sub>). O emprego do NaBH<sub>4</sub> como agente redutor diminui o sinal do branco analítico, garante a obtenção de sinais mais reprodutíveis, diminui o tempo de reação, devido a sua elevada reatividade e pode ser aplicado para um número maior de elementos, tanto por sistemas em batelada quanto em fluxo.<sup>24,83</sup> Contudo, por ser instável, a solução desse agente redutor deve ser preparada diariamente. Para aumentar a sua estabilidade, a solução de NaBH<sub>4</sub> é preparada em KOH ou NaOH 0,05-2% (m v<sup>-1</sup>).<sup>83</sup>

Dentre as principais vantagens associadas à geração de hidretos podemos destacar a separação do analito da matriz, a elevada eficiência do transporte do analito para o atomizador (podendo atingir 100%), a melhor sensibilidade e melhores LODs, principalmente se comparada com a nebulização pneumática. Contudo, a técnica possui algumas limitações como: suscetibilidade a interferências por concomitantes existentes na solução que possam impedir e/ou competir com a reação de geração de hidreto; a cinética de geração de hidreto pode ser afetada por fatores físicos associados à solução; o pH, as concentrações dos reagentes e os estados de oxidação ou a forma na qual o analito se encontra podem ser críticos na geração ou liberação do hidreto.<sup>83,84</sup>

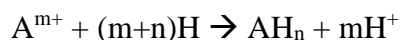
A geração hidretos é compatível com diferentes técnicas, tais como absorção atômica (HG-AAS), absorção atômica com forno de grafite (HG-GF AAS), fluorescência atômica (HG-AFS), emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (HG-ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HG-ICP-MS). Além disso, destaca-se a possibilidade do desenvolvimento de metodologias envolvendo a HG, através da compatibilidade com procedimentos de pré-concentração, bem como da possibilidade de análise de especiação química.

#### *2.4.1 Mecanismo de formação de hidretos voláteis*

O mecanismo envolvido na formação de hidretos voláteis foi criticamente discutido na literatura. O primeiro mecanismo proposto para a geração de hidretos sugere que hidrogênio nascente é formado através da hidrólise do agente redutor em meio ácido, decompondo rapidamente o BH<sub>4</sub><sup>-</sup> em ácido bórico e hidrogênio nascente, conforme a equação<sup>83</sup>:



Após a formação de hidrogênio nascente há a reação de derivatização com a consequente formação do hidreto<sup>83</sup>:



onde A é o analito, m o estado de oxidação do analito e n o número de coordenação do hidreto.

Entretanto, o mecanismo de geração de hidretos via hidrogênio nascente foi sendo cada vez mais contestado. Laborda e colaboradores<sup>85</sup> contestaram fortemente o mecanismo do hidrogênio nascente, principalmente no que diz respeito à formação de hidrogênio e a redução do metal/metaloide, como indicado por uma mudança do estado de oxidação. Considerando que o valor estimado para o potencial padrão de formação ( $E^\circ$ ) para  $H^+/H$  é  $-2,016$  V, nem o tetrahidroborato ( $E^\circ (H_3BO_3)/BH_4^-$ :  $-0,482$  V) nem o zinco metálico ( $E^\circ (Zn^{2+}/Zn$ :  $-0,763$  V) seriam capazes de reduzir prótons ( $H^+$ ) a hidrogênio atômico (H).

O fato de hidretos também poderem ser gerados sob condições básicas foi apresentado como uma evidência de que a geração de hidretos não ocorre via mecanismo de hidrogênio nascente. Qiu e colaboradores<sup>86</sup> avaliaram a eficiência da geração do hidreto de estanho ( $SnH_4$ ) estudando diferentes molaridades dos reagentes: ácido,  $NaBH_4$  e  $NaOH$ . Para estabelecer uma relação entre molaridade dos reagentes e geração do  $SnH_4$ , os autores avaliaram a eficiência de geração dos hidretos com soluções de Sn preparadas em meio ácido e em meio básico. Quando a solução contendo Sn em meio ácido reagiu com o  $NaBH_4 + NaOH$ , os autores observaram que, quando o ácido está presente em excesso, duas reações ocorrem de forma síncrona: a reação de neutralização e de decomposição do  $NaBH_4$ . Quando a solução contendo Sn em meio básico reagiu com o  $NaBH_4 + NaOH$ , o mesmo comportamento foi observado, onde os sinais de intensidade do Sn começaram a ser observados assim que a reação de neutralização começou. Os autores propõem que a reação de neutralização e de decomposição do  $NaBH_4$  ocorrem de forma síncrona. Com isso, os autores concluíram que a geração do  $SnH_4$  não prossegue através de um mecanismo de hidrogênio nascente. Os autores inferem que a geração do hidreto pode ser uma reação induzida ou catalisada pela neutralização de  $H^+$  e  $OH^-$ .<sup>86</sup>

D'Ulivo e colaboradores desenvolveram uma série de trabalhos contestando o mecanismo de hidrogênio nascente, propondo assim o mecanismo de transferência

gradual de átomos de hidrogênio oriundo dos sais de tetrahidroborato para o analito com formação de complexos intermediários analito-borano.<sup>87-90</sup> D'Ulivo e colaboradores<sup>87</sup> avaliaram a geração do hidreto de estanho, estibina ( $\text{SbH}_3$ ) e bismutina ( $\text{BiH}_3$ ) na faixa de pH de 1,4 a 12,7. Com base em cálculos cinéticos, os autores observaram que o mecanismo de hidrogênio nascente falhou em explicar a geração de hidretos na faixa de pH de 4,3 a 12,7. Isso porque a concentração de reagente que é decomposta durante o tempo de reação é em grande parte insuficiente para produzir a concentração mínima de hidrogênio necessário para a conversão do analito em hidreto. Além disso, de acordo com os dados obtidos sobre a fração decomposta dos borano-complexos, complexos  $\text{H}_3\text{B-X}$  são as espécies mais abundante em toda faixa de pH, com exceção do tetrahidroborato a pH 1,4 e 4,7. Dessa forma, os borano-complexos  $\text{H}_3\text{B-X}$  (X:  $\text{H}^-$ ,  $\text{NH}_3$ , *tert*-butil $\text{NH}_2$ ), são as únicas espécies disponíveis para a formação dos hidretos. Isso demonstrou que a geração de hidreto pode ser alcançada diretamente da ação de aminoboranos como agente derivatizante, provavelmente através da transferência de hidrogênio ligado ao boro para o analito.

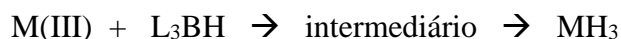
Em outro estudo, uma vez que comumente são utilizadas condições fortemente ácidas para reação de geração química de vapor, D'Ulivo e colaboradores<sup>91</sup> propuseram um modelo de reação por derivatização com aminoboranos em condições fortemente ácidas. A decomposição/hidrólise gradual dos borano-complexos geram espécies intermediárias cujas estruturas químicas são fortemente dependentes do pH e da composição da solução. Os autores observaram que em meio fortemente ácido, na faixa de pH de 0 a 2, a cinética de decomposição/hidrólise do tetrahidroborato e aminoboranos é mais lenta que em pH acima de 3,8. A eficácia do processo de derivatização depende tanto da natureza do substrato que contém o analito quanto da natureza das espécies de hidrobóranos. Em meio aquoso com HCl, as espécies de Hg(II) e Sb(III) são muito reativas e pouco seletivas para todas as espécies de hidrobóranos. Outros analitos reagem preferencialmente com algumas espécies particulares de hidrobóranos. As espécies de Te(IV) e Sn(IV) representam dois exemplos extremos: o Te(IV) reage preferencialmente com as espécies de hidrobóranos formadas em meio fortemente ácido, enquanto que o Sn(IV) é completamente não reativo as espécies de hidrobóranos em meio fortemente ácido. Segundo os autores, o mecanismo de derivação para formação do composto volátil, em qualquer caso, seja em meio fortemente ácido ou em  $\text{pH} > 3,8$ , está relacionado à ação direta de um ou mais átomos de hidrogênio ligados ao átomo do boro.<sup>91</sup>

A inconsistência da formação de hidrogênio nascente pela decomposição/hidrólise do tetraidroborato em meio ácido foi também contestada em estudos realizados com reagentes deuterados. Pergnatis e colaboradores<sup>92</sup> avaliaram a geração de arsina utilizando NaBH<sub>4</sub>, NaBD<sub>4</sub>, HCl, DCl, H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O. Ao reagirem As(III) e As(V) com NaBD<sub>4</sub>, HCl e H<sub>2</sub>O, os autores obtiveram como principal produto de reação a arsina deuterada, AsD<sub>3</sub>. Por outro lado, quando utilizado o NaBH<sub>4</sub>, DCl e D<sub>2</sub>O, foi obtida como principal produto de reação AsH<sub>3</sub>. Com isso, os resultados obtidos por Pergnatis e colaboradores<sup>92</sup> apoiam fortemente o mecanismo de transferência direta do hidrogênio ligado ao boro ao analito. D'Ulivo e colaboradores<sup>89</sup> também avaliaram o uso de NaBD<sub>4</sub> entre outros reagentes deuterados como D<sub>2</sub>O e NaOD. Os autores conseguiram comprovar a formação de intermediários analito-borano. Existem duas hipóteses para o processo<sup>90</sup>:

- i) Os átomos de hidrogênio presentes no hidreto final são oriundos de diferentes moléculas do tetraidroborato



- ii) Os átomos de hidrogênio presentes no hidreto final são oriundos da mesma molécula de tetraidroborato



onde L = H<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O ou OH<sup>-</sup>.

Com as evidências encontradas nos diferentes estudos, pode-se concluir que a arsina é produzida a partir da transferência do hidrogênio ligado diretamente ao boro, refutando assim o mecanismo do hidrogênio nascente.

#### 2.4.2 Transporte dos hidretos voláteis

Uma vez que o procedimento analítico baseado na geração de hidretos consiste em duas etapas independentes, com a geração do composto volátil e a posterior atomização e detecção, existem duas possibilidades de transporte do hidreto até o atomizador: a transferência direta ou a coleta dos hidretos voláteis. Na transferência direta, após a formação dos hidretos, esses são transportados imediatamente para o atomizador/detector. Já quando utilizado o dispositivo de coleta, o hidreto volátil é retido até a finalização do processo de geração de vapor e posteriormente liberado e transportado, todo de uma vez, para o atomizador/detector.<sup>83</sup>

O dispositivo de coleta foi inicialmente empregado visando a obtenção de maior sensibilidade do sinal analítico, uma vez que a cinética de reação entre o redutor metálico utilizado para HG era relativamente lenta. Com isso, ao concentrar previamente o hidreto para então só depois liberá-lo e transportá-lo para o atomizador, permitia-se a obtenção de um sinal de absorvância maior e mais reprodutivo. Contudo, quando o  $\text{NaBH}_4$  passou a ser empregado como agente redutor, a necessidade do uso do dispositivo de coleta passou a ser desnecessária, dada a maior cinética da reação de redução.<sup>84</sup>

Atualmente, os métodos de transferência direta são frequentemente utilizados, sendo o procedimento de coleta aplicado como uma etapa de pré-concentração para a determinação de espécies voláteis presentes em baixas concentrações.

#### 2.4.3 Processo de atomização em tubos de quartzo

Os atomizadores têm por finalidade converter o hidreto ao átomo livre do analito. Muitas técnicas de espectrometria atômica são acopladas a geração de hidretos, o que favorece a possibilidade de serem empregados diferentes tipos de atomizadores. A geração de hidretos pode ser acoplada a técnicas de plasma, como ICP-OES e ICP-MS. Contudo, a espectrometria de absorção atômica (AAS) é a técnica popularmente acoplada à geração de hidretos e possibilita o emprego de atomizadores com tubo de quartzo aquecido ou forno de grafite.

Desde que introduzido por Chu e colaboradores<sup>93</sup>, os atomizadores de tubo de quartzo (QTA), tornaram-se os mais utilizados. O QTA consiste em um tubo

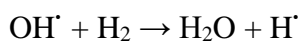
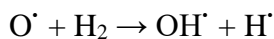
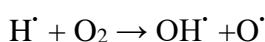
confeccionados em forma de T, o qual é alinhado ao caminho óptico.<sup>83,84</sup> O aquecimento do QTA é externo e pode ser eletrotérmico ou com chama. Este sistema de atomização apresenta uma série de vantagens como alta sensibilidade, baixo ruído de fundo e limites de detecção adequados para determinação de diferentes analitos.<sup>83,94</sup>

As elevadas temperaturas atingidas quando são utilizados plasmas e forno de grafite (temperaturas superiores a 2000 °C) permitem que o hidreto seja decomposto termicamente a átomos livres do analito. Contudo, quando empregados tubos de quartzo, as temperaturas são relativamente baixas, inferiores a 1000 °C. O que favorece o processo de atomização do hidreto no tubo de quartzo é a presença de radicais hidrogênio.

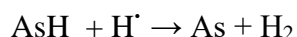
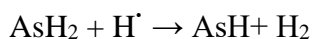
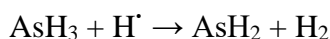
Welz e Melcher<sup>95</sup> realizaram um estudo no qual compararam o efeito de diferentes misturas de gases sobre a atomização da arsina. Geralmente, traços de oxigênio estão naturalmente presentes no atomizador, oriundo da amostra, reagentes, gás carreador ou até da permeabilidade do ar nas conexões e tubos de teflon utilizados no sistema de injeção em fluxo.<sup>83</sup> Os autores observaram que aplicando purga para a remoção de ar nos gases e soluções dos reagentes, o sinal analítico para As foi detectado somente em temperaturas superiores a 1700 °C. Contudo, ao utilizarem gás carreador contendo 1% de O<sub>2</sub> em Ar, os autores não observaram diferença significativa para o sinal analítico em temperaturas de atomização a partir de 600 °C. No primeiro caso, ocorre a atomização da arsina através de decomposição térmica, levando-se em consideração a elevada temperatura envolvida no processo. Já no segundo caso, a presença de oxigênio favorece a formação dos radicais H·, o que leva ao aumento da sensibilidade (mecanismo de atomização via radicalar). Ainda, quando da ausência de H<sub>2</sub>, o sinal analítico foi observado somente em temperaturas superiores a 1700 °C, o que mostra a grande influência dos gases hidrogênio e oxigênio na atomização do hidreto via mecanismo radicalar. Segundo os autores, em temperaturas relativamente baixas a arsina é provavelmente decomposta, contudo não atomizada, levando a formação de espécies moleculares de arsênio (As<sub>2</sub> e As<sub>4</sub>).<sup>95</sup>

Posteriormente, Dedina e Welz<sup>96</sup> avaliaram o uso de diferentes modelos de atomizadores com aquecimento eletrotérmico e atomizador em tubo com chama interna. Para os atomizadores avaliados foi observado o mesmo comportamento no sinal analítico, sugerindo que o mecanismo de atomização radicalar é o mesmo para os diferentes tipos de atomizadores. Além disso, o processo de atomização ocorre em um

pequeno volume do atomizador, próximo a zona de junção T, região essa de maior concentração de radicais hidrogênio. Os autores constataram que uma baixa vazão de oxigênio (2,4 mL min<sup>-1</sup>) desempenha um papel fundamental na geração dos radicais H<sup>•</sup> e, conseqüentemente, na eficiência do processo de atomização dos hidretos. Os autores relatam ainda que quando as vazões de hidrogênio e oxigênio estão presentes em uma proporção menor que 2, nenhum sinal de absorvância pode ser observado para o As.<sup>96</sup> A presença de oxigênio no interior da cela de atomização favorece a formação dos radicais H<sup>•</sup>, responsáveis pela atomização do analito<sup>97</sup>:



A atomização das arsinas ocorre através de mecanismo via radicais hidrogênio. Ao atingir o atomizador ocorre a reação entre o hidreto e a nuvem de radicais hidrogênio presentes na parede do atomizador. Esses radicais tem como função decompor o hidreto em hidrogênio e átomos livres do elemento. A reação de decomposição da arsina ocorre em três etapas de acordo com as equações<sup>96</sup>:



A formação de átomos livres do elemento está diretamente relacionada ao número de colisões com os radicais hidrogênio, e a eficiência de atomização aumenta com o aumento da concentração dos radicais hidrogênio. Tendo em vista o fato de os radicais H<sup>•</sup> estarem presentes em maior concentração na parte central do atomizador, Dědina e Matoušek<sup>94</sup> desenvolveram um novo tipo de atomizador, o multiatomizador *Multiple Microflame Quartz Tube Atomizer* (MMQTA). Este tipo de atomizador foi desenvolvido de modo a aumentar a concentração de radicais hidrogênio ao longo de toda a dimensão do caminho óptico. Muito parecido com o QTA, o multiatomizador MMQTA consiste em dois tubos concêntricos de quartzo de 145 mm de comprimento e



6 mm de diâmetro interno, comparado ao QTA que possui 122 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro interno. Para a introdução de oxigênio ou ar foram adicionadas duas entradas posicionadas em cada extremidade do atomizador. A presença de orifícios posicionados no tubo interno permite a passagem de oxigênio ou ar para a formação de microchamas, aumentando assim a produção de hidrogênio radicalar e estabilizando a nuvem atômica ao longo do tubo óptico. Os autores relatam como vantagens da utilização do multiatomizador o aumento da faixa linear de trabalho e uma maior resistência a interferentes, quando comparado ao QTA convencional. Segundo relatado por Dědina e Matoušek<sup>94</sup> a faixa linear de trabalho para Se aumentou até dez vezes quando comparada a faixa de trabalho quando utilizado o QTA. Ainda, com relação a interferências no processo de atomização, o limite de tolerância a interferência de As sobre o sinal do Se foi de  $0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ , uma ordem de grandeza superior ao limite de tolerância utilizando o QTA ( $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Apesar do melhor desempenho obtido quando comparado ao QTA, o multiatomizador desenvolvido por Dědina e Matoušek<sup>94</sup> foi considerado um protótipo ainda longe do ideal. Segundo os autores, a entrada de ar feita pelas extremidades do multiatomizador ainda levava a uma deficiência de hidrogênio radicalar nas laterais do atomizador. Com isso, de forma a melhorar o desempenho do MMQTA, Matoušek e colaboradores<sup>98</sup> desenvolveram um novo tipo de multiatomizador. Este novo multiatomizador é muito parecido com o desenvolvido anteriormente, com 125 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro interno. O que difere o novo multiatomizador do desenvolvido anteriormente, além do comprimento, é a adição de oxigênio pela parte central do atomizador. Os autores verificaram o melhor desempenho para o novo modelo de multiatomizador, apresentando limites de tolerância de As em Se de  $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e de Se em As de  $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Além disso, não foram obtidas perdas de linearidade até 200 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  para Se e As, respectivamente. Segundo constatado pelos autores, a presença de orifícios uniformiza a distribuição de radicais H $\cdot$  ao longo do multiatomizador, aumentando a eficiência de atomização, além de ser mais resistente às interferências.

Flores e colaboradores<sup>99</sup> realizaram um estudo sistemático para avaliar o desempenho do MMQTA para a determinação de As, Bi, Se e Sb na presença de outros elementos interferentes como As, Bi, Pb, Sb, Se e Sn. Quando utilizado o MMQTA, não foi observada perda de linearidade até 160 ng para Se e Sb e 80 ng para As, o que

correspondeu a um desempenho duas vezes melhor para As, Se e Sb quando comparado ao uso da QTA. Para Bi, a faixa linear foi a mesma (140 ng) utilizando o atomizador QTA ou MMQTA. Em relação à resistência a interferências de elementos formadores de hidretos, os limites de tolerância foram significativamente maiores quando utilizado o MMQTA (aumento de aproximadamente 50%) em comparação ao emprego da QTA convencional, especialmente para as interferências de As, Sb e Se. Contudo, não foi observada diferença na determinação de Se e Sb usando o MMQTA quando o Sn foi utilizado como interferente. O uso do MMQTA proporcionou uma melhor tolerância para interferências de elementos formadores de hidretos e aumento da faixa linear de calibração.<sup>99</sup>

## 2.5 Análise de especiação química de As com geração de hidretos

Uma alternativa frente ao uso de cromatografia convencional para análise de especiação química de As é a associação da geração de hidretos com a técnica de espectrometria de absorção atômica (HG-AAS). O método permite a geração seletiva dos hidretos de diferentes espécies de As, uma vez que as diferentes espécies possuem diferente reatividade e sensibilidade frente ao agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ). A técnica HG-AAS é considerada mais simples que a HPLC-ICP-MS, mais popular e preferida em termos de simplicidade, seletividade, rapidez e menor custo para a determinação de As.

Além da geração da arsina ( $\text{AsH}_3$ ), proveniente do As(III) e As(V), o agente redutor também pode converter as espécies orgânicas de As em hidretos voláteis, formando assim a monometilarsina ( $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ ), dimetilarsina ( $((\text{CH}_3)_2\text{AsH})$ ) e trimetilarsina ( $((\text{CH}_3)_3\text{As})$ ), provenientes, respectivamente, do MMA (III e V), DMA (III e V) e TMAOs. Contudo, uma importante limitação da HG é a impossibilidade de determinar alguns compostos de As, como a AsB, AsC e arsenoaçúcares, uma vez que estes compostos não são capazes de gerar hidretos voláteis. Ainda, a geração de hidretos é criticamente dependente do estado de oxidação do elemento, estando fortemente associado com o pH do meio. De modo geral, a espécie de menor estado de oxidação gera o hidreto com maior eficiência. Esse comportamento é devido à lenta cinética de conversão do As(V) para As(III).<sup>83</sup>

Em ambiente fortemente ácido (pH entre 0 e 2) os hidretos são gerados a partir de espécies orgânicas e inorgânicas de As, independentemente do seu estado de oxidação.<sup>83</sup> Por outro lado, em pH próximo da neutralidade (6-7) são gerados hidretos somente a partir de espécies trivalentes de As (inorgânicas e orgânicas).<sup>83</sup> Em pH acima de 6 ocorre a ionização das espécies pentavalentes de As (desprotonação) e as arsinas são geradas somente a partir de espécies trivalentes de As. Em estudo realizado por Matoušek e colaboradores<sup>100</sup>, o emprego de solução tampão Trizma 0,75 mol L<sup>-1</sup> a pH 6 permitiu que os hidretos fossem gerados somente a partir das espécies trivalentes de As. Ainda, a adição do pré-redutor L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>) às soluções das amostras permitiu a geração de hidretos a partir de As trivalente e pentavalente, sendo a concentração das espécies pentavalentes obtida por diferença.

A concentração de ácido (HCl) também é um fator importante na geração dos diferentes hidretos de As. Em condições fortemente ácidas o As(V) é reduzido eficientemente a As(III) e assim gerada a arsina. No entanto, nessa condição, a eficiência da geração dos hidretos das espécies MMA e DMA cai drasticamente.<sup>51,52,101,102</sup> Em meio fortemente ácido, a respectiva arsina gerada a partir da espécie de DMA reage com o HCl produzindo ácido dimetilarsínico, solúvel em água. Esse comportamento também é esperado para o produto da reação de redução do MMA, uma vez que observa-se uma redução drástica da eficiência de geração do hidreto da espécie em meio altamente ácido.<sup>51,102,103</sup> Consequentemente, quando a mesma concentração ácida é utilizada, para as espécies As(III), As(V), MMA e DMA são observadas diferentes respostas frente à eficiência na geração de hidretos.

A geração seletiva de hidretos já foi aplicada para a análise de especiação química de As em alimentos, água e tecido biológico.<sup>51,52,103-107</sup> Geralmente, a análise de especiação química é alcançada mediante otimização das condições da reação de geração de hidretos, incluindo tipos e concentrações de ácidos, presença de agentes pré-redutores, concentração de NaBH<sub>4</sub> e uso de tampões. O uso de HCl 5 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 2% (m v<sup>-1</sup>) permitiu a geração e determinação seletiva do iAs no arroz.<sup>52</sup> Uma vez que a eficiência da redução é diferente para as duas espécies inorgânicas, a extração foi realizada em meio oxidante, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar o As(III) a As(V). Os autores ainda compararam os resultados do método proposto com o sistema HPLC-ICP-MS, não sendo encontradas diferenças significativas entre os dois métodos de determinação do iAs no arroz. Desse modo, o método proposto é uma alternativa simples frente ao uso do sistema HPLC-ICP-MS, com um LOD de 5 ng g<sup>-1</sup> para iAs.

Condições idênticas também foram utilizadas por Musil e colaboradores<sup>51</sup> para a determinação de iAs em arroz e alga por HG-ICP-MS, sendo o LOD 1 ng g<sup>-1</sup> de iAs.

O uso da HG-AAS mostrou-se também uma alternativa para a determinação das espécies inorgânicas de As em arroz e produtos derivados. A HG seletiva de As(III) pode ser alcançada pelo emprego de HCl 10 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 0,1% (m v<sup>-1</sup>).<sup>104,105</sup> Com a pré-redução de As(V) a As(III), com o uso de ácido ascórbico, antes da determinação por HG-AAS, os autores estimaram a concentração da espécie pentavalente por diferença. Os resultados obtidos da análise de dois materiais de referência certificados de arroz foram concordantes com os valores certificados. Estratégia semelhante foi utilizada por Oliveira e colaboradores<sup>103</sup> para a determinação das espécies inorgânicas de As por HG-AAS em amostras de pescado. O emprego de HCl 3 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 0,2% (m v<sup>-1</sup>) permitiu a geração seletiva do As(III) e As(V) sem contribuição do sinal de absorvância das espécies MMA e DMA. Recuperações quantitativas (87-107%) foram obtidas nos testes de adição do analito e o LOD reportado foi de 5 ng g<sup>-1</sup> para o iAs.

O desenvolvimento recente de métodos incluindo técnicas não cromatográficas baseados na HG expandiu a análise de especiação química de As para matrizes como água e arroz.<sup>106, 107</sup> Geralmente, esses métodos utilizam-se de condições reacionais seletivas na etapa de HG ou de etapa subsequente empregando a coleta dos vapores gerados a partir da reação de redução. Nesse sentido, Pitzalis e colaboradores<sup>106</sup> relataram a especiação de As em água por HG-AAS usando diferentes redutores (NH<sub>3</sub>.BH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>.BH<sub>3</sub> e NaBH<sub>4</sub>) e ácidos (HCl ou HClO<sub>4</sub>), na presença ou na ausência de L-cisteína. A espécie inorgânica As(III) foi determinada após geração seletiva de AsH<sub>3</sub> com o uso de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup> na presença de L-cisteína 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Os hidretos das espécies MMA e DMA foram seletivamente gerados em soluções de HClO<sub>4</sub> 10 e 0,5 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, na presença de L-cisteína 0,2 mol L<sup>-1</sup> e NH<sub>3</sub>.BH<sub>3</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Após a determinação da concentração do As total, os autores estimaram por diferença a concentração de As(V). Welna e colaboradores<sup>107</sup> avaliaram cinco procedimentos de especiação para HG seletiva das espécies de As por HG-ICP-OES. Foram avaliados o uso de ácidos, tampões, redutor e pré-redutor de forma abrangente. Os autores sugerem uma série de protocolos para a determinação seletiva das espécies: (i) *As(III)*: tampão citrato (pH 5,2) e NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>); (ii) *As(III) e DMA*: tampão acetato (pH 4,5) e NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>); (iii) *As(III), As(V) e MMA*: HCl 10 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>) + KI 0,5% (m v<sup>-1</sup>) e

ácido ascórbico 2% (m v<sup>-1</sup>); (iv) MMA e DMA: HCl 2 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>) + L-cisteína 0,5% (m v<sup>-1</sup>); (v) As total: HCl 10 mol L<sup>-1</sup> e NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>) + L-cisteína 0,5% (m v<sup>-1</sup>). Apesar dos autores apresentarem resultados que mostram o potencial da HG como uma alternativa ao uso de métodos cromatográficos, o emprego de diferentes reagentes torna os métodos dispendiosos, difíceis de serem empregados e agressivos ao ambiente e ao operador.

### 2.5.1 Análise de especiação química de As com HG-CT-AAS

Como mencionado anteriormente, o procedimento analítico baseado na geração de hidretos consiste em duas etapas independentes, com a geração do composto volátil e a posterior atomização e detecção. Com isso, existem duas possibilidades de transporte do hidreto até o atomizador: a transferência direta ou a pré-concentração. Na pré-concentração, o hidreto é retido em um dispositivo de coleta até a finalização do processo de HG e, posteriormente, transportado, todo de uma vez, para o atomizador/detector.<sup>83</sup>

Com a finalidade de melhorar os LODs e sensibilidade, a pré-concentração dos compostos voláteis com o uso de aprisionamento criogênico (CT) foi proposta. O método consiste na pré-concentração dos hidretos em um tubo em forma de “U” preenchido com uma fase estacionária específica, o qual é submerso em nitrogênio líquido. Nessa condição, os hidretos ficam retidos e concentrados no tubo na temperatura de aproximadamente -186 °C. Em uma etapa subsequente, os hidretos são volatilizados por aquecimento com o auxílio de uma resistência elétrica e, posteriormente, conduzidos até o atomizador.

A técnica de aprisionamento criogênico tem sido aplicada não somente para a pré-concentração de hidretos, mas também visando a análise de especiação química de As. O procedimento para análise de especiação química de As utilizando esse método tem como base a geração dos hidretos a partir das diferentes espécies de As e posterior separação dos mesmos de acordo com os seus respectivos pontos de ebulição e interação com a fase estacionária. Partindo-se do princípio que as arsina oriundas das diferentes espécies de As possuem diferentes pontos de ebulição (arsina, AsH<sub>3</sub>: -55 °C; metilarquina, CH<sub>3</sub>AsH<sub>2</sub>: 2 °C; dimetilarquina, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsH: 35 °C; trimetilarquina, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>As: 70 °C), uma etapa de aquecimento no tubo pode promover a volatilização

gradativa de cada uma das espécies, efetuando assim a separação das mesmas para posterior atomização e determinação.<sup>83</sup> O emprego da etapa de pré-concentração com o aprisionamento criogênico aliado às técnicas de espectrometria atômica torna possível a análise de especiação química de As, com limites de detecção da mesma magnitude dos obtidos quando utilizadas técnicas cromatográficas. Ainda, o custo operacional é relativamente menor quando comparado ao da técnica de HPLC-ICP-MS, frequentemente utilizada para análise de especiação química de As em alimentos. O emprego do aprisionamento criogênico em conjunto com a HG e AAS (HG-CT-AAS) ou HG e ICP-MS (HG-CT-ICP-MS) já foi aplicado para a análise de especiação química de As em água, material biológico e fármacos.<sup>100,108-111</sup>

Del Razo e colaboradores<sup>108</sup> desenvolveram um método para especiação química de As empregando a geração seletiva e aprisionamento criogênico para a posterior determinação por HG-CT-AAS em amostras de água, urina e cultura de células. A eficiência de geração dos hidretos é fortemente dependente do pH e está relacionada aos valores de pKa de cada espécie. O rigoroso controle do pH do meio reacional permitiu aos autores a geração seletiva de hidretos a partir do analito em diferentes formas químicas e estados de oxidação. Em ambiente ácido (pH baixo), os hidretos são gerados a partir de espécies orgânicas e inorgânicas de As, independentemente do seu estado de oxidação. Nessa condição as espécies de As encontram-se protonadas, o que favorece a formação dos hidretos voláteis. Por outro lado, em pH neutro (próximo de 6) as arsinas podem ser formadas apenas de espécies trivalentes de As, uma vez que em pH acima de 6 as espécies pentavalentes são desprotonadas, permanecendo em solução de forma ionizada e não propensas à geração de hidretos.<sup>83</sup>

O tamponamento das soluções de urina, água e cultura de células a pH 6 com solução tampão Tris-HCl permitiu a geração seletiva das espécies trivalentes de As, As(III), MMA(III) e DMA(III).<sup>108</sup> Quando os autores acidificaram o meio reacional com HCl para obtenção de um pH final 2, a geração de hidretos de ambas espécies trivalentes e pentavalentes de As foi observada. Com a diferença entre as concentrações obtidas em pH 2 e 6 os autores estimaram as concentrações das espécies As(V), MMA(V) e DMA(V). Os limites de detecção para As(III), MMA(III) e DMA(III) foram de 1,1; 1,2; 6,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Adicionalmente, o método de adição e recuperação do analito foi empregado para a validação do método proposto e recuperações acima de 91% foram obtidas para todas as espécies de As avaliadas.<sup>108</sup>

Devesa e colaboradores<sup>112</sup> também utilizaram o ajuste de pH do meio reacional para a análise de especiação de metabólitos de As em amostras de urina por HG-CT-AAS. A adição da solução tampão Tris-HCl 2,5 mol L<sup>-1</sup> às amostras e ajuste do pH à 6, permitiu a geração seletiva dos hidretos das espécies As(III), MMA(III), DMA(III) e TMA<sub>2</sub>O. Além disso, o método apresentou recuperação quantitativa para as espécies químicas em estudo (93 a 98%). Foram obtidos limites de detecção de 0,27; 0,22; 0,38 e 0,14 ng para as espécies As(III), MMA(III), DMA(III) e TMA<sub>2</sub>O, respectivamente, e 0,40; 0,24 e 0,31 ng para As(V), MMA(V) e DMA(V), respectivamente.

Nos trabalhos realizados por Del Razo e colaboradores<sup>108</sup> e Devesa e colaboradores<sup>112</sup>, apesar de se tratarem de métodos que permitiram a pré-concentração das espécies e determinação das mesmas em baixas concentrações, distintas sensibilidades foram obtidas para as diferentes espécies de As. Com isso, os autores relataram a necessidade de construção de curvas de calibração para cada uma das espécies de As em cada meio avaliado (pH 1-2 e 6). De forma a contornar essa dificuldade e garantir sensibilidade equivalente para as diferentes espécies de As, além de facilitar o procedimento de calibração, Matoušek e colaboradores<sup>100</sup> avaliaram a adição de um pré-redutor a uma solução contendo iAs, MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O. Os autores avaliaram o uso de uma solução L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>) para a prévia redução das espécies pentavalentes de As. Para o procedimento os autores separaram duas alíquotas: (i) sem adição da solução pré-redutora para geração seletiva das arsinas oriundas de espécies trivalente de As; e (ii) adição da solução pré-redutora, para geração das arsinas de todas as espécies de As (pentavalentes e trivalentes). Ainda, para garantir um maior controle do pH do meio para a geração seletiva dos hidretos, os autores utilizaram uma solução tampão Trizma 0,75 mol L<sup>-1</sup> a pH 6. Inicialmente os hidretos oriundos das diferentes espécies de As foram gerados a partir da reação com o redutor NaBH<sub>4</sub> e retidos no tubo em forma de “U”, o qual foi preenchido com a fase estacionária a base de diatomita Chromosorb WAW-DCMS. A etapa de aprisionamento dos hidretos no tubo foi realizada sob resfriamento do mesmo com nitrogênio líquido. A parte externa do tubo foi revestida com uma resistência, o qual foi aquecida e os hidretos gradualmente revolatilizados, ocorrendo assim a separação das espécies de acordo com o seu respectivo ponto de ebulição e propriedades cromatográficas. Os autores verificaram a mesma sensibilidade para as espécies iAs, MMA e DMA com a adição da solução pré-redutora, o que possibilitou a construção da curva de calibração a partir de

uma única espécie de As. Foram obtidos limites de detecção de 0,18 e 0,06 ng para o iAs e para as espécies metiladas, respectivamente.

Zavala-Hernández e colaboradores<sup>109</sup> também aplicaram o sistema HG-CT-AAS para a determinação das espécies inorgânicas de As, MMA e DMA em tecido biológico de ratos que foram submetidos à ingestão de água contaminada com As(III) para desenvolvimento de estudos toxicológicos e avaliação dos metabólitos de As. Primeiramente as espécies de As foram homogeneizadas e extraídas com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 mol  $\text{L}^{-1}$  e aquecimento a 90 °C por uma noite (etapa de *overnight*), seguida da etapa de neutralização com hidróxido de sódio. Para a geração seletiva dos hidretos das espécies trivalentes de As,  $\text{NaBH}_4$  1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e Tris-HCl 0,75 mol  $\text{L}^{-1}$  a pH 6 foram utilizados. Os autores relataram limites de detecção obtidos da ordem de 8 a 20 pg para as espécies tri e pentavalentes de As. O método de adição do analito foi empregado e recuperações de 78 a 117% foram obtidas para as espécies de As avaliadas. O sistema HG-CT-AAS demonstrou-se sensível para a determinação de todos os principais metabólitos de As em matrizes biológicas complexas.

A determinação de espécies de As em materiais de referência certificados para água de rio e água de mar, bem como a aplicação para amostras de células epiteliais foi realizada por Matoušek e colaboradores<sup>110</sup> utilizando a HG-CT-ICP-MS. Para comparação dos resultados, a análise por HG-CT-AAS também foi realizada. A determinação das espécies de As em diferentes estados de oxidação foi possível através da etapa de pré-redução com L-cisteína (somatório das espécies tri e pentavalentes) ou sem etapa de pré-redução (geração de hidretos somente de espécies trivalentes). A etapa de geração seletiva dos hidretos a pH 6 foi realizada utilizando Tris-HCl 0,75 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{NaBH}_4$  0,5% ( $\text{m v}^{-1}$ ). Os hidretos foram aprisionados em um tubo em forma de “U”, o qual foi gradualmente aquecido para a separação das arsinas e posterior detecção por ICP-MS. Limites de detecção de 1,2; 0,040; 0,069 e 0,10 ng  $\text{L}^{-1}$  foram alcançados para As(III), MMA(III), DMA(III) e TMA<sub>3</sub>O, respectivamente. Os limites de detecção para as espécies de iAs, MMA e DMA com adição de L-cisteína foram de 3,4; 0,055 e 0,14 ng  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Recuperações de 102, 95 e 107% foram obtidas para a iAs, MMA e DMA, respectivamente. Ainda, quando comparadas às técnicas de HG-CT-ICP-MS e HG-CT-AAS, os autores não encontraram diferenças significativas para as concentrações das diferentes espécies de As. Ambas as técnicas de HG-CT-AAS e HG-CT-ICP-MS mostraram-se sensíveis para análise de especiação de As, além de apresentar uma maior tolerância a matrizes como água do mar ou amostras biológicas,



que possuem alto teor salino e de matéria orgânica, que por sua vez, poderiam inviabilizar o emprego de métodos cromatográficos comumente utilizados para análise de especiação química de As, como a HPLC-ICP-MS.

Recentemente, Svoboda e colaboradores<sup>113</sup> propuseram a miniaturização no sistema de aprisionamento criogênico por HG-CT-AAS. A miniaturização foi possível após os autores demonstrarem a distribuição espacial do analito no tubo U, com o uso de o isótopo radioativo <sup>73</sup>As. Os autores verificaram que as arsinas são aprisionadas a cerca de 3 cm na entrada do tubo em U, o que sugere uma afinidade das arsinas com a fase estacionária Chromosorb. Uma vez que as arsinas se encontram concentradas na entrada do tubo em U, os autores verificaram a possibilidade de diminuir o comprimento do mesmo, desenvolvendo um capilar em forma de U. O capilar de 20 cm de comprimento consiste de sílica fundida não-polar, o qual é recoberto com poliamida (0,53 mm de diâmetro interno e 0,65 mm de diâmetro externo). Para proteger o capilar de possíveis danos mecânicos e danos causado pela alta pressão no sistema, 90% do comprimento do capilar (cerca de 18 cm) foi alocado dentro de um tubo de politetrafluoretileno de 0,75 e 1,56 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente. Para a coleta das arsinas, cerca de um terço do comprimento do sistema foi imerso em nitrogênio líquido e para a etapa de volatilização o capilar foi apenas retirado do nitrogênio líquido e exposto à temperatura ambiente, sem etapa de aquecimento. O capilar proposto pelos autores demonstrou equivalente desempenho para aprisionamento das arsinas comparado ao uso do tubo em forma de “U” convencional. Alguns parâmetros experimentais foram avaliados para a maior eficiência de separação das arsinas das espécies de As. A influência da vazão do gás de arraste foi avaliada e a melhor sensibilidade e reprodutibilidade foi obtida quando a vazão de 35 mL min<sup>-1</sup> de He foi utilizada. Contudo, apesar de permitir o aprisionamento das arsinas sem perdas, a volatilização por aquecimento e separação das mesmas foi insatisfatória quando utilizado o capilar desenvolvido. Enquanto o tubo em U convencional utilizado nos trabalhos anteriores serve como uma ferramenta de coleta e de separação, o capilar em U desenvolvido pelos autores pode ser empregado apenas como uma ferramenta de coleta. Como um dispositivo de coleta e pré-concentração, o uso do capilar demonstrase mais econômico, com consumo de nitrogênio líquido menor e o custo de investimento substancialmente menor do que o do tubo em U.

Apesar da HG-CT-AAS permitir a pré-concentração e separação das espécies de As, além de ser uma alternativa de instrumentação de menor custo, quando comparada

às técnicas cromatográficas convencionais, até o presente momento não existem trabalhos que relatam o seu emprego para análise de especiação de As em arroz. Além disso, no Brasil, ainda não há um método analítico oficial que permita a análise de especiação do As em suas frações orgânica e inorgânica, sendo exigida apenas a expressão da concentração total de As. Atualmente, os Laboratórios de Defesa Agropecuária (LFDAs) têm como meta o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos para a quantificação do As total e das frações orgânica e inorgânica de As em alimentos. Essa estratégia visa atender as demandas adotadas pela Coordenação Controle de Resíduos e Contaminantes (CRC), gestora do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), para o monitoramento de espécies químicas de As em alimentos. O crescente interesse na especiação química de As em alimentos reforça a importância do desenvolvimento métodos de especiação química de As por HG-CT-AAS.

### 3. Objetivo

O objetivo geral do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método para a análise de especiação química de As em arroz mediante emprego da espectrometria de absorção atômica com a geração de hidretos e aprisionamento criogênico (HG-CT-AAS). Além disso, o trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método que possa atender as políticas de controle de espécies químicas de As em alimentos.

#### 3.1 Objetivos específicos:

- 1) Otimização do sistema HG-CT-AAS semiautomatizado considerando, principalmente, os parâmetros de composição e vazão do gás carreador, aprisionamento, volatilização e resolução de separação para as espécies químicas iAs, MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O.
- 2) Avaliar o procedimento de extração utilizando HNO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup> e investigar possível interconversão das espécies químicas de As pelo preparo de amostra.
- 3) Determinar o teor total de As no arroz por HG-AAS, no sentido de verificar a recuperação de As obtido com a análise de especiação.
- 4) Determinar as espécies químicas de As em diferentes tipos de arroz utilizando o sistema HG-CT-AAS.
- 5) Avaliar os principais parâmetros de mérito do método analítico proposto, como os limites de detecção e quantificação e exatidão, através de ensaios de adição e recuperação do analito, bem como pela análise de material de referência certificado. Avaliar também a exatidão do método através da comparação dos resultados obtidos por HG-CT-AAS com a técnica LC-ICP-MS.
- 6) Avaliar as informações obtidas acerca da concentração de iAs no arroz e estimar a ingestão diária (EDI) para avaliação do risco de exposição ao consumo do arroz.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Instrumentação

A determinação de As foi feita com o emprego de um espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 200, PerkinElmer) equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo, em conjunto com o sistema de injeção em fluxo comercial FIAS 100 (PerkinElmer). Como fonte de radiação foi utilizada uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL), operada a 400 mA. O comprimento de onda selecionado foi de 193,7 nm, sendo 2,7 e 2,3 nm a largura e a altura da fenda espectral, respectivamente. Todas as medidas foram obtidas em absorvância integrada. Para a análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS, os sinais foram obtidos em modo de absorvância integrada e posteriormente integrados com o uso do software Excel (Microsoft Office).

Para o ajuste do pH no preparo da solução tampão e das amostras para a análise mediante HG-CT-AAS, um potenciômetro digital modelo 781 (Metrohm) equipado com um eletrodo de vidro combinado e com sensor de temperatura foi utilizado. A agitação da solução foi realizada com o auxílio de agitador magnético modelo 801 (Metrohm).

Para a extração das espécies de As a partir do arroz, uma chapa de aquecimento modelo C-Mag HS7 (Ika) foi utilizada. A separação das fases da suspensão da amostra obtida após extração foi realizada com o auxílio de uma centrífuga modelo Baby 206 (Fanem).

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica digital modelo AUY220 (Shimadzu) com precisão e capacidade máxima de 0,0001 g e 220 g, respectivamente.

O arsênio total também foi determinado utilizando um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) modelo PinAAcle 900T (PerkinElmer) equipado com autoamostrador AS 900. Para isso, foi utilizado um tubo de grafite com plataforma de L'vov integrada, com recobrimento pirolítico e com aquecimento transversal. A correção de fundo é baseada no efeito Zeeman. O programa e as condições utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante.

## 4.2 Reagentes e soluções

Água purificada (em sistema Milli-Q Integral, Merck Millipore) com resistividade final de 18,2 MΩ cm a 25 °C foi utilizada no preparo de todas as amostras e soluções. Ácido nítrico 65% (m m<sup>-1</sup>) e ácido clorídrico 37% (m m<sup>-1</sup>) (Merck) foram purificados por destilação abaixo do ponto de ebulição em sistema *sub-boiling* Distillacid BSB-939-IR (Berghof), para posterior utilização.

Soluções de tetrahidroborato de sódio foram preparadas diariamente a partir de NaBH<sub>4</sub> (99% puro, Acros Organics) em concentrações de 0,75 e 1% (m v<sup>-1</sup>) para as determinações de As total e das espécies de As, respectivamente. As soluções foram preparadas em NaOH 0,01% (m v<sup>-1</sup>, Merck). Para a pré-redução das espécies de As nas soluções de calibração e amostras, L-cisteína (Sigma-Aldrich) 2% (m v<sup>-1</sup>) foi utilizada.

Solução de Trizma 0,75 mol L<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.HCl; Sigma-Aldrich) à pH 6 foi utilizada como solução tampão para o controle do pH durante as determinações das espécies de As por HG-CT-AAS. O ajuste de pH foi realizado utilizando uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.

Para a determinação do As total, as soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição da solução estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de As(V) (Titrisol, Merck). Para a determinação de As total por HG-AAS, as curvas de calibração foram preparadas em K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 0,2% (m v<sup>-1</sup>, Synth) e HNO<sub>3</sub> 1% (v v<sup>-1</sup>), com faixa de concentração de 0,5 a 12,0 µg L<sup>-1</sup>. Para a determinação de As total por GF AAS, as curvas de calibração foram preparadas em HNO<sub>3</sub> 2% (v v<sup>-1</sup>) com concentração de 0,75 a 20,0 µg L<sup>-1</sup>.

As soluções de referência das espécies As(III) e DMA foram preparadas a partir de diluição de uma solução estoque contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de As. A solução estoque foi obtida através da dissolução de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck) e H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub> (Acros Organics), respectivamente, em água previamente sonicada. A sonicação foi realizada para a remoção de oxigênio dissolvido, prevenindo assim uma possível oxidação do As(III). As soluções das espécies MMA e TMAOs foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As como MMA – Na<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Chem. Service) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As como TMAOs – (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>AsO. Para a análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS, as curvas de calibração foram preparadas diariamente contendo as três espécies de As como As(III), MMA e DMA em L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>). Para a calibração da espécie TMAOs foram preparadas as soluções de calibração na ausência do pré-redutor. A faixa de concentração variou de 0,25 a 5,0 µg L<sup>-1</sup>.

#### *4.2.1 Limpeza do material*

Os frascos de polipropileno utilizados, assim como as vidrarias em geral, foram descontaminados em HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) por um período mínimo de 48 horas. Transcorrido esse período, os mesmos foram enxaguados com água ultrapura e secos à temperatura ambiente. A limpeza da cela de atomização consistiu na imersão da mesma em uma solução de HNO<sub>3</sub>/HF, na proporção 7:3, por 10 minutos, sendo em seguida enxaguada com água ultrapura e deixada secar à temperatura ambiente.

### **4.3 Amostras**

Cinquenta e três amostras de arroz produzidas e adquiridas em mercados e feiras do Brasil, compreendendo diferentes tipos e variedades, foram selecionadas para o presente trabalho. Além disso, sete amostras produzidas em outros países foram analisadas. As amostras foram cominuídas em moinho equipado com haste de impacto modelo A11 (Ika) e armazenadas em frascos de polipropileno até a análise.

#### *4.3.1 Preparo da amostra para a determinação de As total*

Para a extração do As total na amostra de arroz foi utilizado o procedimento otimizado em um trabalho anterior.<sup>105</sup> Aproximadamente 250 mg da amostra cominuída foi pesada e transferida para um frasco graduado de vidro, ao qual foram adicionados 1 mL de HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) e 2 mL de uma solução contendo K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2% (m v<sup>-1</sup>), mistura oxidante para a total conversão das espécies de As à As(V). A mistura então foi aquecida em banho-maria a 85 ± 5 °C por 3 horas. Após resfriamento, o volume foi completado a 10 mL com água ultrapura. A mistura então foi centrifugada a 459 g (1600 rpm, raio médio 160 mm) por 5 min e o sobrenadante reservado para posterior determinação do As total por HG-AAS.

No sentido de avaliar a exatidão do método de extração para As total, cinco amostras de arroz foram escolhidas arbitrariamente e submetidas ao processo de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para determinação de As total mediante GF AAS, como uma técnica independente. Para isso, o sistema micro-

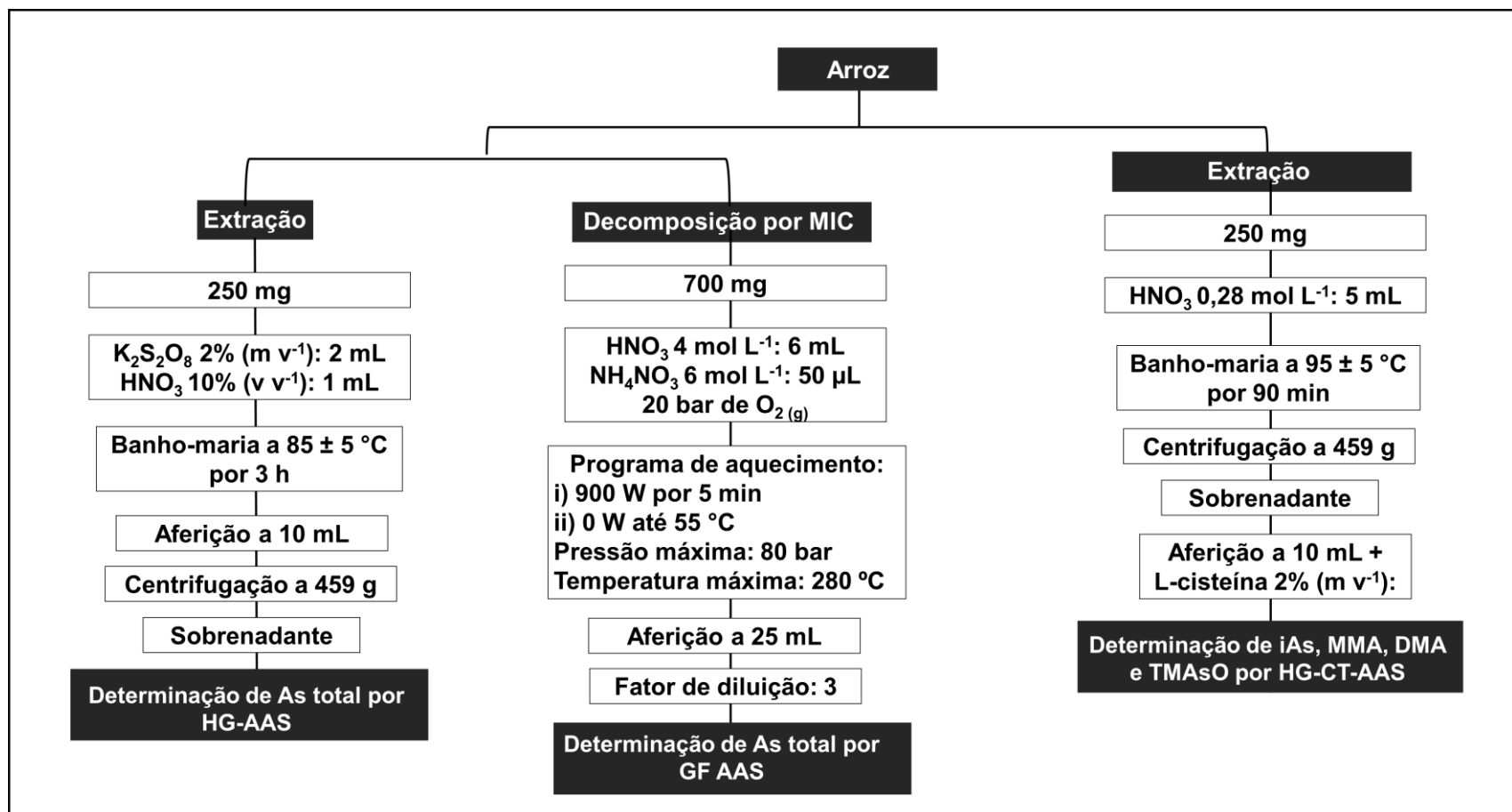
ondas Multiwave PRO (Anton Paar) equipado com frascos fechados de quartzo com capacidade para 80 mL foi utilizado. Para o método de decomposição por MIC foram utilizados suportes comerciais de quartzo e um sistema de pressurização dos frascos, fornecidos pelo mesmo fabricante do forno micro-ondas. O procedimento de decomposição por MIC aplicado às amostras foi baseado como descrito na literatura para posterior determinação de As em alimentos.<sup>114-116</sup> Para isso, 700 mg de arroz foram acondicionados em invólucros de polietileno e selados com auxílio de uma resistência térmica. O invólucro contendo a amostra foi então posicionado na base do suporte de quartzo do sistema MIC contendo papel filtro umedecido com 50 µL de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol L<sup>-1</sup> (iniciador da combustão). O suporte contendo a amostra foi então colocado no frasco de quartzo com 6 mL da solução absorvedora ( $\text{HNO}_3$  4 mol L<sup>-1</sup>) e após, os frascos foram fechados e pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$ . O programa de radiação micro-ondas foi de *i*) 900 W por 5 min (etapa de refluxo) e *ii*) 0 W até 55 °C (etapa de arrefecimento). Após, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e aferidos com água ultrapura até o volume de 25 mL. As soluções então foram reservadas para posterior determinação do As total por GF AAS.

#### *4.3.2 Procedimento de extração para especiação química de As*

Para a extração das espécies de As presentes no arroz seguiu-se a metodologia proposta por Huang e colaboradores<sup>2</sup>, o qual também é recomendada pela FDA para extração de espécies de As em arroz.<sup>37</sup> Dessa forma, 5 mL de  $\text{HNO}_3$  0,28 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados a 250 mg de amostra e a mistura aquecida em banho-maria a  $95 \pm 5$  °C por 90 min. Após aquecimento, a solução foi mantida em repouso para arrefecimento e quando a temperatura ambiente foi atingida, foi feita a etapa de centrifugação a 459 g (1600 rpm, raio médio 160 mm) por 5 min e separado o sobrenadante. Ao sobrenadante, foi aplicado um procedimento de neutralização com a adição de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> até atingir pH 6. Para a pré-redução das espécies foi adicionado 200 mg de L-cisteína e o volume aferido a 10 mL com água ultrapura. A determinação das espécies de As por HG-CT-AAS foi realizada após uma hora da adição do pré-redutor.

Todas as etapas envolvidas na análise de especiação química de As em arroz por diferentes técnicas analíticas estão apresentadas na Figura 4.

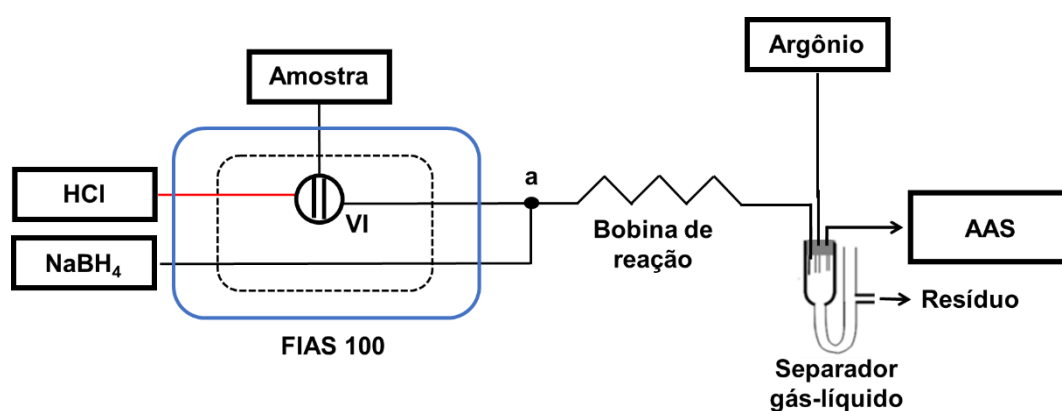




**Figura 4.** Etapas envolvidas na análise de especiação química de As em arroz.

#### 4.4 Sistema HG-AAS para determinação de As total

A determinação de As total por HG-AAS foi realizada empregando atomização em cela de quartzo (QTA) aquecida eletricamente a 900 °C. O QTA utilizado possui dimensões de 160 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro interno. As condições utilizadas para a determinação de As total mediante HG-AAS foram otimizadas em trabalho anterior.<sup>105</sup> O sistema utilizado para a determinação de As total é esquematizado na Figura 5.



**Figura 5.** Representação do sistema utilizado para a determinação de As total por HG-AAS. Carreador: HCl (1 mol L<sup>-1</sup>; vazão 4 mL min<sup>-1</sup>); alça de amostragem: 250 µL; VI: válvula de injeção; a: ponto de confluência para adição do agente redutor: NaBH<sub>4</sub> 0,75% (m v<sup>-1</sup>) + NaOH 0,01% (m v<sup>-1</sup>) (vazão 4 mL min<sup>-1</sup>); gás de arraste: argônio (50 mL min<sup>-1</sup>).

Conforme o esquema mostrado na Figura 5, a amostra inicialmente entra em contato com o carreador (HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) através da válvula de injeção “VI” do sistema FIAS e posteriormente é misturada com o agente redutor (NaBH<sub>4</sub> 0,75% m v<sup>-1</sup> + NaOH 0,01% (m v<sup>-1</sup>)) em uma confluência “ponto a”. A mistura reacional é então conduzida para o separador gás-líquido onde o argônio (Ar) auxilia no transporte do hidreto volátil até o atomizador (QTA). O separador gás-líquido com tubo de vidro em forma de “U” foi desenvolvido no laboratório e é baseado no mecanismo de separação gravitacional. O uso desse tipo de separador gás-líquido garantiu que não houvesse efervescência excessiva durante a reação de redução, o que poderia resultar na

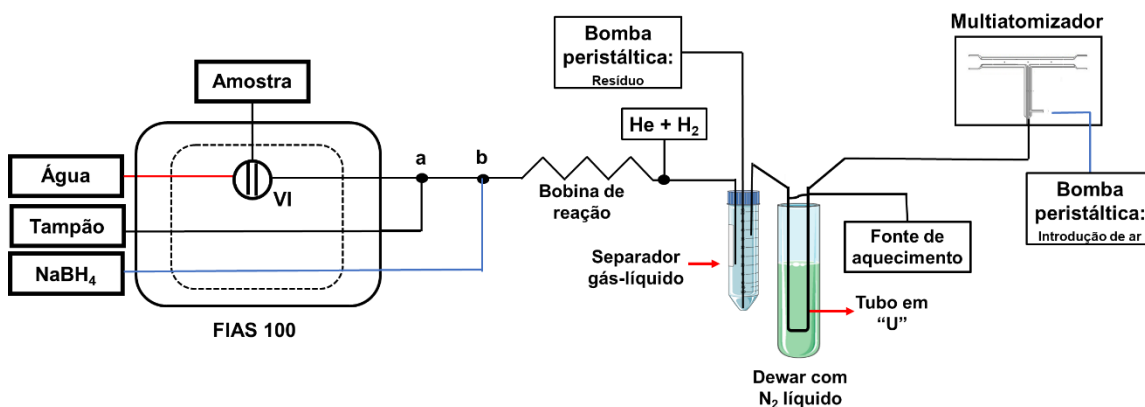
transferência de vapor de água para a cela de atomização e no aumento do ruído. Um tubo de politetrafluoretileno (PTFE) de 100 cm de comprimento com 0,8 mm de diâmetro interno foi utilizado para transportar a solução da confluência “ponto a” para o separador gás-líquido.

#### **4.5. Sistema HG-CT-AAS para análise de especiação química de As**

Para a montagem do sistema HG-CT-AAS seguiu-se o procedimento descrito na literatura.<sup>100,109,111</sup> Para a propulsão dos reagentes e da amostra, tubos Tygon de 1,09 mm de diâmetro interno foram utilizados, no sentido de obter uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>. Nos pontos de confluência dos reagentes e amostra foram utilizadas conexões poliméricas de poliétercetona (PEEK) em forma de “T” (0,75 mm de diâmetro interno) e flanges (RheFlex F6). Uma bobina de reação de 100 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno foi utilizada para favorecer a reação de redução com a subsequente geração dos hidretos. Uma conexão de PEEK em forma de “T” foi utilizada após a bobina de reação para a inserção do gás carreador no sistema, uma mistura de 20% de H<sub>2</sub> em He a uma vazão de 99,7 mL min<sup>-1</sup>. A vazão do gás carreador foi controlada utilizando um controlador mássico modelo 32907-61 (Cole-Parmer Instrument Company). Para a condução da mistura reacional para o descarte após a análise, uma bomba peristáltica modelo Perimax 12 (Spetec) foi utilizada a uma vazão aproximada de 1,6 mL min<sup>-1</sup>. Ainda, uma outra bomba peristáltica, modelo IP High Precision Multichannel Pump (IsmaTec) foi utilizada para a introdução de ar atmosférico no multiatomizador (24,4 mL min<sup>-1</sup>). As vazões dos gases adicionados foram previamente calibradas com o uso de um bolhómetro, isto é, medindo-se o tempo gasto por uma bolha para percorrer uma pipeta graduada (20 mL).

A etapa de aquecimento do tubo em “U” foi executada com auxílio de uma resistência elétrica (resistividade de 15,1 Ω) para volatilização gradativa das espécies de As mediante uso de uma fonte de energia Variac modelo 116 (PowerStat) com faixa de trabalho de 0–140V e 0–10A. O atomizador utilizado foi o mutiatomizador MMQTA, que foi gentilmente fornecido pelo Prof. Jiří Dědina da Academia de Ciências da República Tcheca. O MMQTA utilizado consiste em dois tubos concêntricos de quartzo com 120 mm de comprimento, 14 mm de diâmetro externo e 7 mm de diâmetro interno. O aquecimento eletrotérmico do MMQTA foi realizado a 900 °C. O controle do sistema

FIAS foi realizado pelo mesmo programa de controle e coleta de dados do espectrômetro de absorção atômica (WinLab 32 for AA). O tempo de permanência do tubo em “U” no *dewar* contendo nitrogênio líquido, bem como o aquecimento do mesmo, foram realizados manualmente. O arranjo do sistema utilizado para especiação de As mediante HG-CT-AAS é mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Representação do sistema utilizado para a especiação química de As por HG-CT-AAS. Carreador: água (vazão 2 mL min<sup>-1</sup>); alça de amostragem: 500 µL; VI: válvula de injeção; a: ponto de confluência para adição da solução tampão: Trizma (0,75 mol L<sup>-1</sup> a pH 6; vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>); b: ponto de confluência para adição do agente redutor: NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>) + NaOH 0,01% (m v<sup>-1</sup>) (vazão 2 mL min<sup>-1</sup>); gás de arraste: mistura He+H<sub>2</sub> (99,7 mL min<sup>-1</sup>); vazão de ar atmosférico: 24,4 mL min<sup>-1</sup>; voltagem aplicada para aquecimento do tubo em “U”: 25 V.

Conforme o esquema mostrado na Figura 6, a amostra entra inicialmente em contato com o carreador (água) através da válvula de injeção **VI** e posteriormente é misturada com a solução tampão (Trizma 0,75 mol L<sup>-1</sup> a pH 6) em uma confluência “ponto **a**”. A amostra então entra em contato com o agente redutor (NaBH<sub>4</sub> 1% (m v<sup>-1</sup>) + NaOH 0,01% (m v<sup>-1</sup>)) em uma segunda confluência “ponto **b**”, onde a mistura reacional é então conduzida para o separador gás-líquido através da bobina de reação. No separador gás-líquido, a mistura de gases He+H<sub>2</sub> auxilia no transporte dos hidretos voláteis até o tubo em “U”. O resíduo é removido do separador gás-líquido com o auxílio de uma bomba peristáltica. No tubo em “U” ocorre a etapa de aprisionamento

criogênico e por aquecimento gradativo do mesmo, a separação das espécies de As, as quais são conduzidas até o atomizador. A introdução de ar atmosférico no MMQTA foi feita com o auxílio de uma bomba peristáltica, cuja vazão calibrada foi de  $24,4 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.5.1 Separador gás-líquido

Um frasco de polipropileno de fundo cônico (Sarstedt) com capacidade de 50 mL foi modificado para o uso como separador gás-líquido (Figura 7). Para minimizar a formação de aerossol, a mistura reacional foi inserida no separador gás-líquido de modo que ficasse em contato com a parede do frasco. A tampa do frasco foi modificada com uma cobertura de acrílico no sentido de suportar a pressão de retorno, de aproximadamente 0,3 atm, ocasionada durante a passagem do gás de arraste pelo tubo em “U” preenchido com a fase estacionária.



**Figura 7.** Frasco de polietileno modificado para uso como separador gás-líquido na análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS.

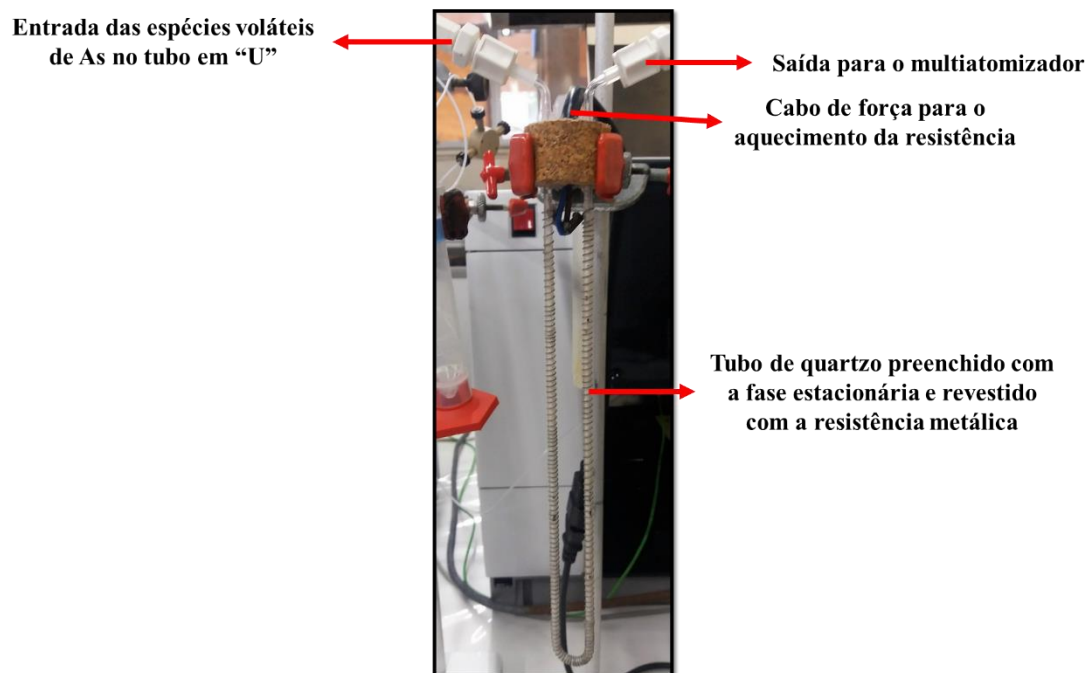
Na cobertura de acrílico foram feitos três orifícios para o encaixe de flanges de PEEK. O primeiro orifício permite a entrada da mistura reacional proveniente da alça de reação. Através do segundo orifício, com o auxílio de uma bomba peristáltica, o separador gás líquido é drenado com o uso de um tubo PTFE posicionado na base do frasco e o resíduo recolhido em um frasco para o posterior descarte. No terceiro orifício, os hidretos são conduzidos para o tubo em “U” para a etapa de aprisionamento.

#### *4.5.2 Preparo do tubo para a etapa de aprisionamento criogênico*

O tubo em forma de “U”, de quartzo utilizado no sistema de aprisionamento criogênico no presente trabalho, possui 305 mm de comprimento total, com 4,5 mm de diâmetro externo, 2,5 mm de diâmetro interno e largura de 24 mm. O tubo para aprisionamento criogênico foi gentilmente fornecido pelo Prof. Jiří Dědina da Academia de Ciências da República Tcheca.

Primeiramente, o tubo foi preenchido com a fase estacionária a base de diatomita (sílica), Chromosorb WAW-DMCS 45/60 (Supelco), com tamanho de partícula de 45 a 60 mesh. Para isso foram utilizados aproximadamente 1000 mg da fase estacionária. Uma pequena quantidade de lã de vidro foi inserida em ambas as extremidades do tubo, no sentido de evitar o deslocamento da fase estacionária devido à pressão do fluxo do gás de arraste. Quatro alíquotas de 25  $\mu$ L de agente silanizador, 1,1,1-trimetilsilano (Rejuv8, Sigma), foram sucessivamente adicionadas ao tubo. A cada alíquota adicionada do agente silanizador, uma purga com o gás de arraste foi realizada, totalizando assim 8 horas de tratamento do tubo.

Para a etapa de aquecimento do tubo em “U”, a parte externa do mesmo foi recoberta com uma resistência elétrica de Ni80/Cr20 (Omega), com resistência total de 15,1  $\Omega$ . Para a fixação da resistência, cola de silicone foi utilizada. A resistência foi então conectada com a fonte de alimentação através de um cabo de força, o qual foi fixado utilizando material isolante. Na Figura 8 é apresentada a foto com o tubo já preparado para o uso no presente estudo.



**Figura 8.** Tubo em "U" utilizado para o aprisionamento criogênico na análise de especiação química de As por HG-CT-AAS.

Devido ao reduzido diâmetro interno do tubo em "U", de 2,5 mm, foi observada a retenção de vapor de água ao final de, aproximadamente, 100 ciclos para a determinação de As. Com isso, foram necessários aplicar ciclos de aquecimento da resistência para a remoção de água no tubo. O emprego da etapa de aquecimento foi feito com a utilização do gás carreador no sentido de evitar o superaquecimento da fase estacionária e, conseqüentemente, evitar a remoção do agente silanizador.

#### 4.5.3 O aprisionamento criogênico e a determinação das espécies de As por HG-CT-AAS

O sistema de aprisionamento dos hidretos de As utilizado no presente trabalho consistiu na imersão do tubo em "U" em um *dewar* contendo nitrogênio líquido. Esse sistema foi operado manualmente. Após a geração das espécies voláteis, os hidretos foram retidos e pré-concentrados no tubo em "U" (temperatura de  $-186^{\circ}\text{C}$ ). Para a volatilização gradativa dos hidretos das espécies de As, o tubo em "U" foi retirado do *dewar* e a resistência elétrica aquecida gradualmente. Os hidretos das espécies de As,

então, são separados de acordo com seus respectivos pontos de ebulição e propriedades cromatográficas, e transportados para o multiatomizador para detecção.

A unidade FIAS 100 foi a responsável pelo controle do sistema semiautomatizado empregado para a análise de especiação química de As por HG-CT-AAS. O tempo de imersão do tubo em “U” em nitrogênio líquido, bem como o controle da bomba peristáltica responsável pelo descarte do resíduo no separador gás-líquido foi controlado manualmente. As etapas do sistema FIAS são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Programa FIAS utilizado para análise de especiação química de As mediante HG-CT-AAS em sistema semiautomatizado

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Bomba 1 (rpm)</b>	<b>Bomba 2 (rpm)</b>	<b>Posição da válvula</b>	<b>Leitura</b>	<b>Aquecimento</b>	<b>Imersão do tubo em “U” em N<sub>2(l)</sub></b>
Prefill	30	40	90	Fill		Não	Sim
1	60	40	0	Inject		Não	Sim
2	90	0	0	Inject		Não	Sim
3	20	0	0	Inject		Sim	Não
4	30	0	0	Inject	57 s	Sim	Não
5	7	0	0	Inject		Não	Não
6	58	0	0	Inject		Sim	Não
7	40	0	90	Fill		Sim	Não
8	3	0	90	Fill		Não	Sim

A etapa de *prefill* no programa consiste no preenchimento dos capilares pelos reagentes e da alça de amostragem pela amostra. Após, na primeira etapa, a amostra é injetada, entrando em contato com o carreador e os reagentes, por um período de 60 segundos. Nessa etapa ocorre a geração dos hidretos das espécies de As, os quais são introduzidos no separador gás-líquido juntamente com o gás de arraste (mistura He+H<sub>2</sub>). Nas etapas 1 e 2, os hidretos são transportados para o tubo em “U”, onde ocorre a etapa de aprisionamento. Nas etapas 3 e 4, através do aquecimento gradual do



tubo em “U” ocorre a volatilização dos hidretos das espécies de As, os quais são conduzidos ao multiatomizador. A interrupção do aquecimento do tubo em “U” na etapa 5 foi necessária para a completa separação das espécies DMA e TMA<sub>2</sub>O. O aquecimento foi retomado na etapa 6 para a volatilização do TMA<sub>2</sub>O e mantido na etapa 7 para a etapa de limpeza. Na etapa 8, o tubo em “U” foi novamente imerso em nitrogênio líquido e pronto para ser utilizado em uma nova sequência. A Figura 9 ilustra a montagem do sistema utilizado para a determinação das espécies de As por HG-CT-AAS.



**Figura 9.** Montagem do sistema utilizado para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS

## 5. Resultados e discussão

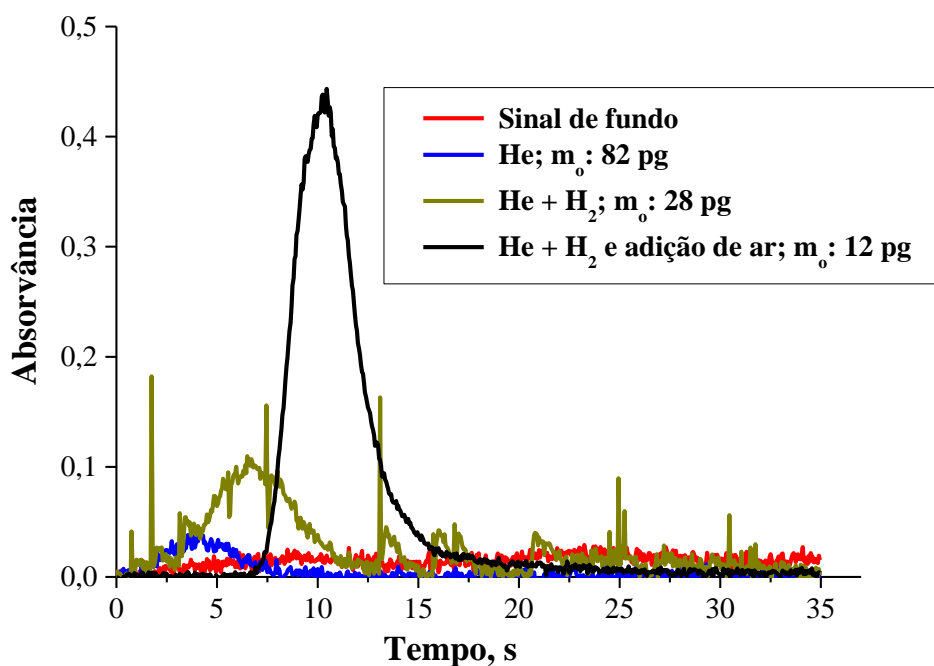
### 5.1 Otimização do sistema HG-CT-AAS semiautomatizado

O sistema automatizado de HG-CT-AAS foi aplicado na literatura para a análise de especiação química de As em amostras biológicas e fármacos.<sup>100,109,111</sup> Tendo como base os trabalhos anteriores reportados na literatura, procurou-se a otimização do sistema HG-CT-AAS semiautomatizado para a análise de especiação de As no arroz. Os critérios selecionados para comparação do desempenho analítico do sistema HG-CT-AAS, em estudo, foram a sensibilidade e a resolução dos cromatogramas obtidos para as diferentes espécies de As. Para isso, levou-se em consideração a sensibilidade, através da avaliação da massa característica ( $m_0$ ). A massa característica é a massa do elemento que produz 1% de absorção, ou seja, uma absorvância integrada igual a 0,0044 abs.s, sendo assim, quanto menor a  $m_0$ , melhor é a sensibilidade do método. Outro parâmetro utilizado para a avaliação da otimização do sistema HG-CT-AAS semiautomatizado foi a resolução dos cromatogramas obtidos para as diferentes espécies de As.

#### 5.1.1 Estudo da demanda de hidrogênio e oxigênio para a atomização da arsina $AsH_3$

Usualmente, a cela de atomização do tipo QTA é empregada para a determinação de As mediante HG-AAS. Como mencionado anteriormente, o mecanismo de atomização na QTA é baseado na formação de hidrogênio radicalar proveniente da reação de hidrogênio com o oxigênio em uma temperatura próxima de 900 °C. Contudo, alguns problemas relacionados ao uso desse atomizador estão associados ao fato de os radicais hidrogênio estarem presentes em maior concentração na parte central do atomizador. De modo a aumentar a concentração de radicais hidrogênio ao longo de todo o caminho óptico, Dědina e Matoušek<sup>94</sup> desenvolveram o MMQTA. A presença de orifícios posicionados no tubo interno permite a passagem de oxigênio ou ar atmosférico para a formação das microchamas, aumentando assim a produção de hidrogênio radicalar e a nuvem atômica ao longo do atomizador.

Uma vez que o presente trabalho utiliza a MMQTA para a etapa de atomização na determinação das espécies de As, inicialmente foi avaliada a influência de diferentes misturas de gás carreador sobre o perfil do sinal de absorvância do As(III). Para o estudo, foi utilizada uma solução de referência na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de As(III) e um volume de injeção de  $500 \mu\text{L}$  ( $2,5 \text{ ng As}$ ) frente ao uso de: (i)  $88,6 \text{ mL min}^{-1}$  de He; (ii)  $88,6 \text{ mL min}^{-1}$  de uma mistura de 20% de  $\text{H}_2$  em He; e (iii)  $88,6 \text{ mL min}^{-1}$  de uma mistura de 20% de  $\text{H}_2$  em He com a introdução de uma pequena quantidade de ar ( $16,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) no MMQTA. Com isso, foi observada a variação da absorvância integrada e  $m_0$  nas diferentes composições do gás carreador e com adição de ar no atomizador. Na Figura 10 são apresentados os perfis dos sinais de absorvância do As(III) para as três misturas de gases estudadas.



**Figura 10.** Perfis dos sinais de absorvância do As a partir de uma solução contendo  $2,5 \text{ ng}$  de As(III), variando-se a composição do gás carreador e com adição de ar no atomizador.

Quando utilizado somente He como gás carreador, um baixo sinal de absorvância do As foi observado ( $m_0$  82 pg). Esse comportamento está em concordância com os resultados obtidos por Welz e Melcher,<sup>95</sup> uma vez que em estudo realizado pelos

autores a ausência de gás hidrogênio no interior do atomizador inviabiliza o processo de atomização da arsina, não sendo possível observar sinal de absorvância para o As na temperatura de 900 °C. Segundo os autores, na ausência de hidrogênio, o sinal de absorvância para o As pode ser observado somente em temperaturas superiores a 1700 °C, conforme estudo termodinâmico. Esse fato indica a grande influência do gás hidrogênio no processo de atomização da arsina, via mecanismo radicalar.

De acordo com a Figura 9, pode-se observar que quando utilizada a mistura He+H<sub>2</sub> como gás carreador, a sensibilidade do As(III) foi aproximadamente três vezes superior (m<sub>o</sub> 28 pg) em relação à sensibilidade obtida quando empregado somente He como gás carreador. Isso já era esperado, uma vez que a quantidade de hidrogênio introduzida no atomizador favorece a formação de radicais com influência direta sobre a eficiência de atomização do hidreto de As, aumentando assim o sinal do As. Ao atingir o atomizador, a arsina reage com os radicais H<sup>•</sup>, decompondo-se em hidrogênio e em átomos livres de As (As<sup>0</sup>).

Ainda, conforme observado na Figura 10, quando utilizada a mistura de gases He e H<sub>2</sub> juntamente com uma pequena quantidade de ar introduzido no MMQTA, a sensibilidade alcançada (m<sub>o</sub> 12 pg) é duas vezes superior à sensibilidade obtida quando utilizada apenas a mistura He+H<sub>2</sub> (m<sub>o</sub> 28 pg). Dědina e Welz<sup>96</sup> constataram que uma pequena vazão de oxigênio (2,4 mL min<sup>-1</sup>) desempenha um papel fundamental na geração dos radicais H<sup>•</sup> e, conseqüentemente, na eficiência do processo de atomização da arsina. Os resultados estão em concordância com o relatado na literatura onde, para uma maior sensibilidade, além da presença de hidrogênio, uma pequena concentração de oxigênio no atomizador é requerida.

Tendo em vista os resultados obtidos, uma otimização criteriosa em relação à proporção entre os gases hidrogênio e oxigênio foi feita, no sentido de garantir uma maior produção de radicais H<sup>•</sup> e, assim, favorecer o processo de atomização que por consequência aumenta a sensibilidade para o As. Para a realização desse estudo, uma solução de referência de 5 µg L<sup>-1</sup> de As(III) (2,5 ng As) foi utilizada. Ainda, no sentido de avaliar apenas o efeito da contribuição dos radicais H<sup>•</sup> e O<sup>•</sup> no processo de atomização, a vazão total dos gases foi mantida próxima a 125 mL min<sup>-1</sup>. Esta vazão total foi considerada conforme constatado em trabalhos anteriores que utilizam o sistema HG-CT-AAS automatizado, nos quais foram empregadas as vazões de 75 mL min<sup>-1</sup> de He, 15 mL min<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub> e 35 mL min<sup>-1</sup> de ar.<sup>100,109,110</sup> Como fonte de

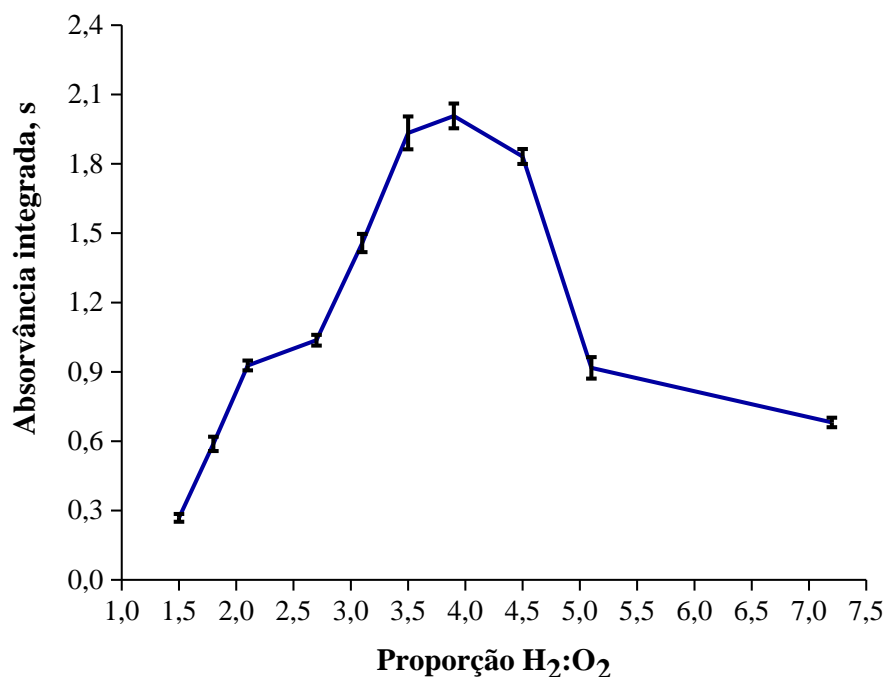
oxigênio, o ar atmosférico foi adicionado no MMQTA com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Para o cálculo da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>, levou-se em consideração o hidrogênio presente na mistura He+H<sub>2</sub> (20%) e o oxigênio presente no ar atmosférico (21%). Ainda, as vazões dos gases adicionados foram previamente calibradas com o uso de um bolhometro, isto é, medindo-se o tempo gasto por uma bolha para percorrer uma pipeta graduada (20 mL). Na Tabela 3 são apresentadas as condições utilizadas para o estudo em relação à proporção entre os gases hidrogênio e oxigênio.

**Tabela 3.** Vazões dos gases utilizadas para a avaliação da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> sobre a sensibilidade do As(III).

<b>Proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub></b>	<b>Mistura H<sub>2</sub> + He (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>H<sub>2</sub> (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ar atmosférico (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>O<sub>2</sub> (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vazão total dos gases (mL min<sup>-1</sup>)</b>
1,5	75,8	15,2	48,4	10,2	124
1,8	81,1	16,2	43,4	9,10	124
2,1	87,0	17,4	38,9	8,16	126
2,7	92,6	18,5	32,3	6,79	125
3,1	95,2	19,1	29,5	6,19	125
3,6	98,9	19,8	26,2	5,51	125
3,9	99,7	19,9	24,4	5,11	124
4,5	103	20,6	21,8	4,58	125
5,1	104	20,8	19,4	4,07	124
7,2	110	22,1	14,5	3,05	125

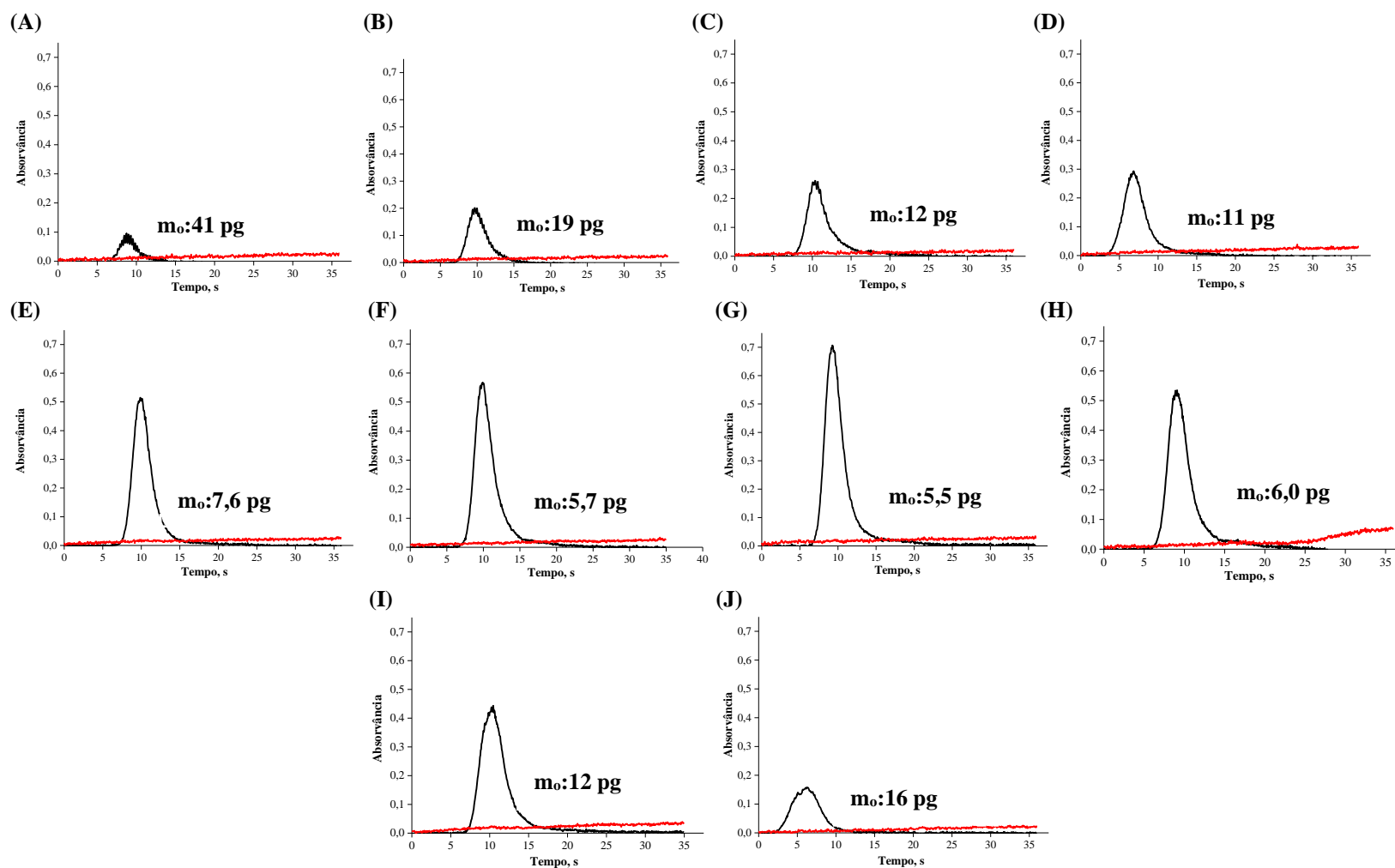
Na Figura 11, são apresentados os resultados em absorvância integrada para uma solução de referência de As(III) em razão das diferentes proporções de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> na composição do gás carreador.



**Figura 11.** Variação da absorvância integrada do As em função da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> na composição do gás carreador a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III) (n=5).

Conforme é possível observar na Figura 11, há um acréscimo da sensibilidade juntamente com o aumento da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 1,5 a 3,9. No multiatomizador, o hidrogênio é gradualmente consumido ao longo do tubo, a partir da sua reação com o oxigênio. Quando a vazão de oxigênio é elevada, o hidrogênio é rapidamente consumido pelo oxigênio, diminuindo assim, a produção de espécies radiculares necessárias para uma eficiente decomposição da arsina em átomos livres de As (As<sup>0</sup>). Com isso, há uma tendência em aumentar a sensibilidade do As(III) com a diminuição da vazão de ar atmosférico adicionado ao MMQTA, como foi observado em proporções de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 1,5 a 3,9. Ainda, como observado na Figura 11, em proporções de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> superiores a 3,9, há uma redução na sensibilidade. Isso se deve a baixa da quantidade de oxigênio presente no interior do MMQTA, que diminui a produtividade da formação de radicais H<sup>•</sup> para o processo de atomização do hidreto de As.

Além da avaliação sobre a absorvância integrada para o As(III), os perfis dos sinais de absorvância obtidos para cada uma das proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> foram também avaliados. Na Figura 12 são apresentados os perfis dos sinais de absorvância obtidos para o estudo da composição do gás carreador.



**Figura 12.** Perfis dos sinais de absorvância para uma solução de referência de 2,5 ng de As(III), (na cor preta) em diferentes proporções de  $H_2O_2$ : (A) 1,5; (B) 1,8; (C) 2,1; (D) 2,7; (E) 3,1; (F) 3,6; (G) 3,9; (H) 4,5; (I) 5,1; (J) 7,2. Os sinais de fundo estão representados pela cor vermelha.

Conforme observado na Figura 11, as proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,6, 3,9 e 4,5 foram as que apresentaram melhor sensibilidade para o As(III), com menores valores de m<sub>0</sub>. Os valores de absorvância integrada obtidos foram de 1,934 ± 0,071; 2,007 ± 0,053 e 1,832 ± 0,032 abs.s para as proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,6, 3,9 e 4,5, respectivamente. A análise estatística ANOVA (*Analysis of Variance*) foi aplicada para verificar se havia diferença estatística entre os valores de absorvância integrada encontrados e, com um nível de confiança de 95%, os resultados apresentaram diferença estatística ( $p = 0,0009$ ,  $\alpha$  crítico = 0,05). Com isso, foram então escolhidas as duas proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> com melhor sensibilidade, 3,6, 3,9 e aplicado teste *t*. O resultado para a análise dos dados indicou que não há diferença significativa para os valores de absorvância integrada em um nível de confiança de 95% ( $t$  calculado: 1,50;  $t$  crítico: 2,77; 4 graus de liberdade). A proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,9 foi a escolhida, levando-se em consideração o menor desvio padrão, bem como o perfil do sinal de absorvância obtido (Figura 12). Com isso, 99,7 mL min<sup>-1</sup> da mistura de gases He+H<sub>2</sub> e 24,4 mL min<sup>-1</sup> de ar atmosférico são necessários para a obtenção da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,9.

Ainda, foram feitos estudos adicionais com o emprego de gás oxigênio ao invés de ar no MMQTA. Para isso, os testes foram divididos em duas partes: (i) mantendo a proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> próxima a 3,9, alterando assim a vazão total dos gases; e (ii) mantendo a vazão total dos gases próximos a 125 mL min<sup>-1</sup>, alterando as proporções de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>. Para isso, uma solução de referência de 5 µg L<sup>-1</sup> de As(III) (2,5 ng As) foi utilizada e os resultados comparados com os dados obtidos com a adição de ar como fonte de oxigênio no MMQTA.

Na primeira parte do estudo (i), a proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> próxima a 3,9 foi mantida, variando-se a vazão total de gases de 64,3 a 129 mL min<sup>-1</sup>. Vale destacar, que nesse estudo a razão estequiométrica H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> variou em uma faixa de 3,9 a 4,3. A vazão total dos gases adicionados ao MMQTA foi reduzida, no sentido de verificar o aumento da concentração da nuvem atômica no interior do atomizador, que por consequência favorece o ganho de sensibilidade. Na Tabela 4 são apresentadas as condições utilizadas para o estudo, bem como os valores dos sinais de absorvância integrada para As.



**Tabela 4.** Vazões dos gases utilizados e os resultados de absorvância integrada para a avaliação da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,9 sobre a sensibilidade do As(III) obtida a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III), utilizando oxigênio no MMQTA (n=5).

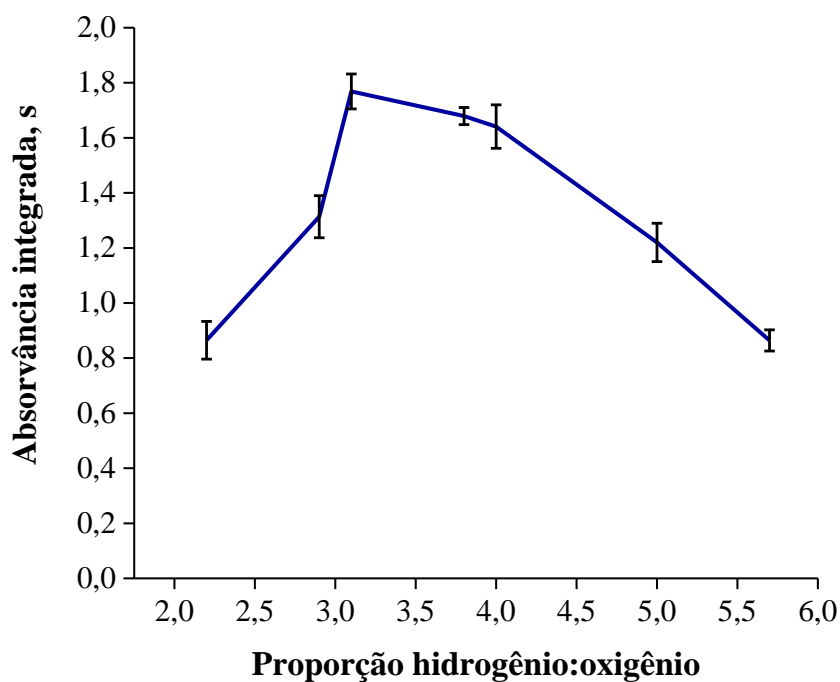
Proporção H <sub>2</sub> :O <sub>2</sub>	Mistura H <sub>2</sub> + He (mL min <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	Vazão total dos gases (mL min <sup>-1</sup> )	Absorvância integrada, abs. s
3,9	123	24,6	6,19	129	1,641 ± 0,079
4,0	103	20,7	5,01	108	1,533 ± 0,077
4,3	94,0	18,8	4,38	98,3	1,417 ± 0,047
4,3	83,2	16,6	3,88	87,0	1,210 ± 0,047
3,9	61,2	12,2	3,08	64,3	1,177 ± 0,064

Como observado na Tabela 4, conforme a vazão total dos gases adicionados ao MMQTA diminui, um decréscimo na sensibilidade do As(III) foi observado. Para vazões de 129; 108; 98,3; 87,0 e 64,3 mL min<sup>-1</sup> foram obtidas m<sub>o</sub> de 6,7; 7,2; 7,8; 9,1 e 9,3 pg, respectivamente. O decréscimo na sensibilidade pode estar associado à baixa taxa de deslocamento da arsina, favorecendo sua solubilidade e, conseqüentemente, diminuindo sua concentração na fase vapor. Com isso, verificou-se que uma alta vazão total dos gases é requerida para o transporte do hidreto gerado para o tubo em “U” e conseqüentemente à cela de atomização.

Para a segunda parte do estudo (*ii*), a adição de gás oxigênio no MMQTA foi feita, variando a proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 2,2 a 5,7. Vale destacar que o planejamento inicial do estudo consistiu em manter a vazão total de gases próximas a 125 mL min<sup>-1</sup>. Contudo, após o procedimento de calibração da vazão dos gases, a vazão total dos mesmos variou de 128 a 130 mL min<sup>-1</sup>. As condições utilizadas para o estudo são apresentadas na Tabela 5. Na Figura 13 são apresentados os resultados obtidos de absorvância integrada para o As(III) com o emprego de diferentes proporções dos gases H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> utilizando-se oxigênio no MMQTA.

**Tabela 5.** Vazões dos gases utilizadas para a avaliação da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> sobre a sensibilidade de uma solução contendo 2,5 ng de As(III) adicionando oxigênio no MMQTA.

Proporção H <sub>2</sub> :O <sub>2</sub>	Mistura H <sub>2</sub> + He (mL min <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	Vazão total dos gases (mL min <sup>-1</sup> )
2,2	117	23,4	10,7	128
2,9	120	23,9	8,34	128
3,1	121	24,1	7,66	128
3,8	122	24,4	6,50	128
4,0	123	24,6	6,19	129
5,0	125	24,9	5,01	130
5,7	125	25,0	4,38	129



**Figura 13.** Variação da absorvância integrada do As em função de diferentes proporções H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> a partir de uma solução de referência de 2,5 ng de As(III) adicionando oxigênio no MMQTA (n=5).

Conforme observado na Figura 13, comportamento similar foi obtido para a sensibilidade do As(III) quando utilizado oxigênio ou com adição de ar no MMQTA. Contudo, a região de máxima sensibilidade obtida com a adição de oxigênio puro no MMQTA foi na proporção de H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> 3,1, valor diferente do obtido com a adição de ar como fonte de oxigênio no MMQTA, de 3,9. Esse resultado é concordante com o relatado na literatura, no qual o estudo realizado por Matoušek e colaboradores<sup>98</sup> indicou a proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3 como a condição de melhor sensibilidade para a formação de radicais H<sup>•</sup> no interior do atomizador, quando utilizado o MMQTA. Com isso, quando utilizado oxigênio puro no MMQTA, para a obtenção da condição de melhor sensibilidade da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> de 3,1 são necessários 121 mL min<sup>-1</sup> da mistura de gases He+H<sub>2</sub> e 7,66 mL min<sup>-1</sup> de oxigênio.

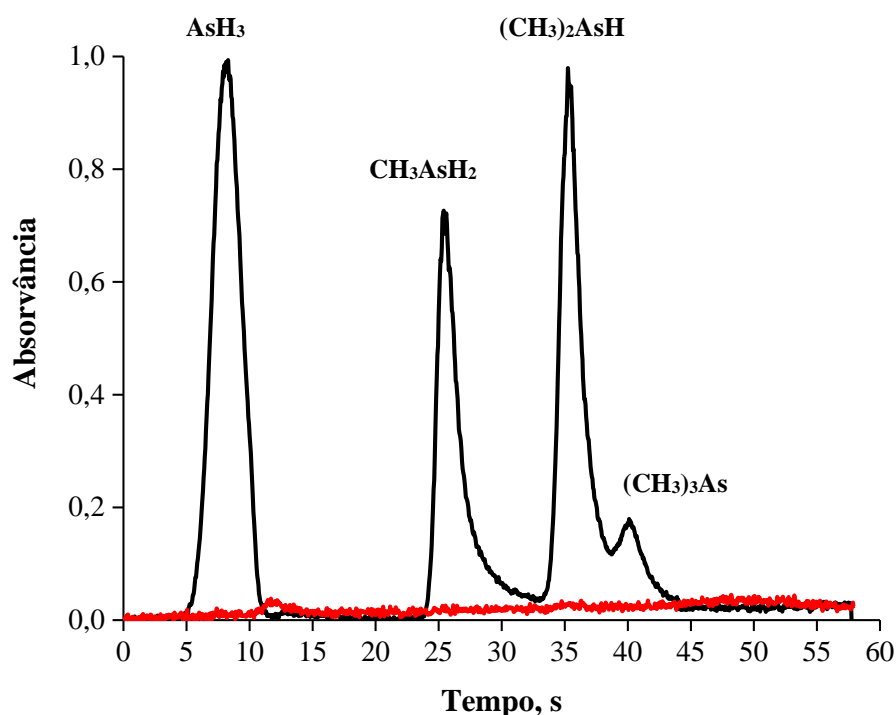
Com os resultados obtidos para os valores de absorvância integrada nas melhores condições estabelecidas no estudo da proporção H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>, o teste estatístico foi aplicado para comparação dos valores. Valores de absorvância integrada de  $2,007 \pm 0,054$  e  $1,768 \pm 0,063$  abs.s foram obtidos para a adição de ar e oxigênio puro no MMQTA, respectivamente. Quando aplicado o teste *t*, verificou-se uma diferença significativa para os valores de absorvância integrada em um nível de confiança de 95% (*t* calculado: 6,44; *t* crítico: 2,77; 4 graus de liberdade). Vale destacar que os valores de m<sub>0</sub> obtidos foram de 5,5 e 6,2 pg, respectivamente, para a adição de ar e oxigênio puro no MMQTA. Não foi possível elucidar o motivo da melhor sensibilidade alcançada com a adição de ar no atomizador ao invés de oxigênio. Contudo, pode-se inferir que outros compostos presentes no ar atmosférico como, por exemplo N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e vapor de água, desenvolvam uma função adicional à formação de radicais com o conseqüente favorecimento da produção de átomos no estado fundamental.

Considerando-se os resultados obtidos, optou-se pela inserção de ar no MMQTA como fonte de oxigênio. Além da melhor sensibilidade obtida com o uso de ar atmosférico, trata-se de uma fonte de oxigênio de alta disponibilidade, viabilidade e menor custo.

### *5.1.2 Aprisionamento e separação das espécies de As*

Depois de selecionada a melhor condição para as vazões do gás carreador e de ar introduzido no multiatomizador, a avaliação dos parâmetros para o aprisionamento e separação das espécies de As utilizando o sistema HG-CT-AAS semiautomatizado foi

estudada. Para isso, as condições do programa FIAS descrito por Matoušek e colaboradores<sup>100</sup> foram utilizadas (Tabela 2 do item 4.5.3). A resolução de separação entre as espécies de As estudadas e a sensibilidade das mesmas foram os parâmetros considerados nessa etapa. Na Figura 14 é apresentado o perfil do sinal de absorvância obtido com o uso dos parâmetros do sistema em acordo com a literatura.

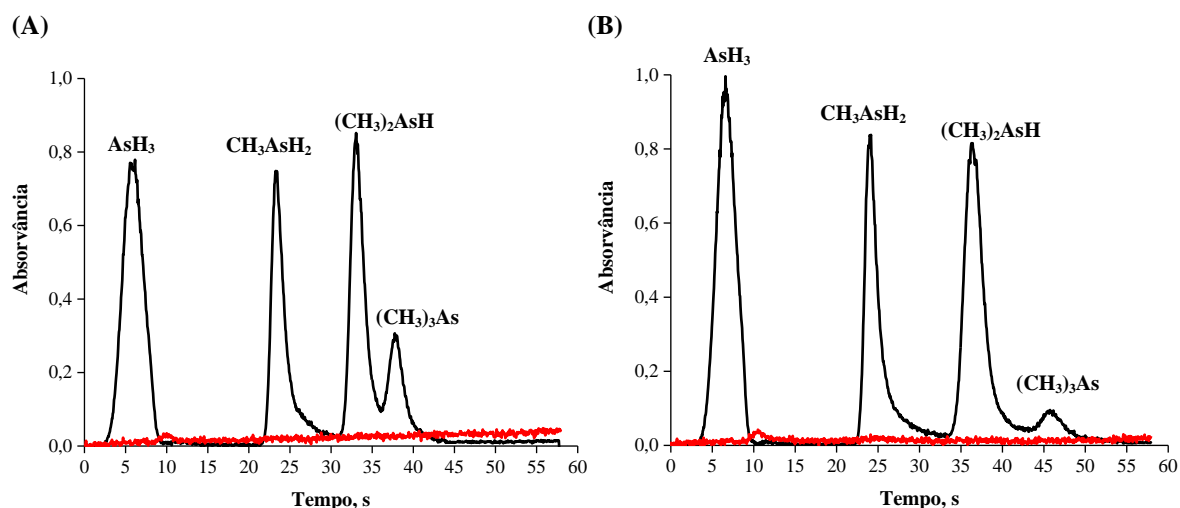


**Figura 14.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução de referência de 2,5 ng de As na forma de As(III), MMA, DMA e TMAso (em preto) na presença de L-cisteína 2% ( $\text{m}^{-1}$ ). O sinal de fundo está representado pela cor vermelha.

Conforme pode ser observado na Figura 14, os tempos de eluição para as espécies As(III), MMA e DMA foram de aproximadamente 5, 25 e 35 segundos, respectivamente. Esses tempos de eluição estão em concordância com os relatados na literatura para as espécies de As utilizando o sistema HG-CT-AAS automatizado.<sup>100,109</sup> Contudo, uma baixa eficiência de separação para as espécies DMA e TMAso foi obtida. Isso pode estar relacionado à alta taxa de aquecimento utilizada para a volatilização das arsinas di- e tri-substituídas,  $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$  e  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ . Apesar de ser aplicada uma interrupção do aquecimento do tubo por

7 segundos na etapa 5 como proposto por Matoušek *et al.*<sup>100</sup>, o tempo não foi suficiente para separação das espécies DMA e TMAOs.

No sentido de aumentar a resolução de separação das espécies DMA e TMAOs, foram alterados os tempos das etapas 4 (de 30 s) e 5 (de 7 s) do programa FIAS mencionado na Tabela 2 (item 4.5.3). Vale destacar que as mudanças foram feitas sem a alteração do tempo total do programa. Para isso foram feitas duas modificações: (i) 25 e 12 segundos nas etapas 4 e 5, respectivamente; (ii) 20 e 17 segundos nas etapas 4 e 5, respectivamente. Os perfis dos sinais de absorvância obtidos são apresentados na Figura 15.



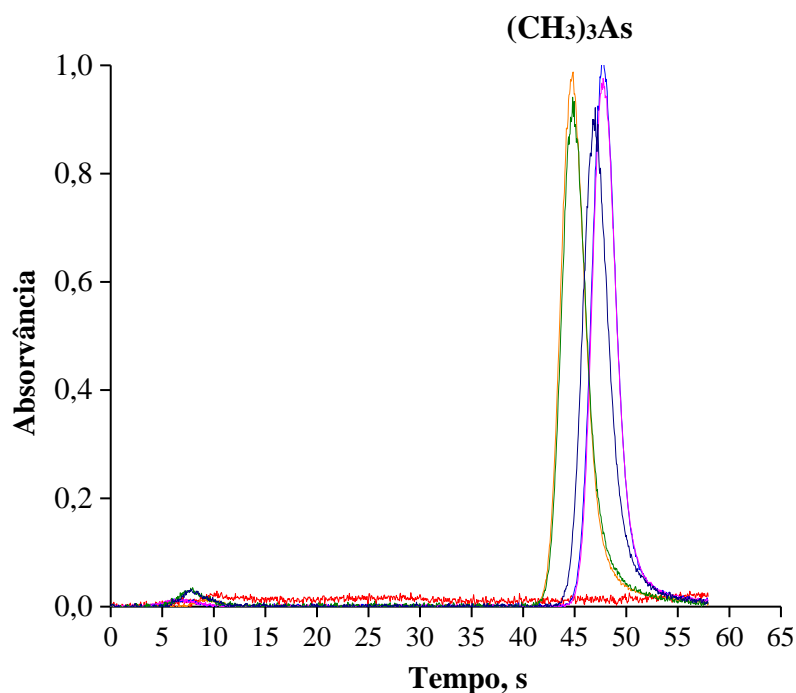
**Figura 15.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução de referência de 2,5 ng de As na forma de As(III), MMA, DMA e TMAOs (em preto) na presença de L-cisteína 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ). (A) FIAS etapa 4 - 25 s, FIAS etapa 5 - 12 s; (B) FIAS etapa 4 - 20 s, FIAS etapa 5 - 17 s. O sinal de fundo obtido está representado em vermelho.

Como pode ser visto na Figura 15 uma pequena melhora na resolução de separação das espécies DMA e TMAOs foi obtido quando aplicado 25 e 12 segundos nas etapas 4 e 5, respectivamente. Quando utilizado nas etapas 4 e 5, 20 e 17 segundos, respectivamente, a completa separação das espécies DMA e TMAOs foi observada.

Com relação a espécie TMAOs, conforme eram realizadas sucessivas leituras, uma redução significativa na intensidade do sinal para a espécie foi observada. Esse

comportamento está em concordância com o relatado na literatura, uma vez que essa espécie é reduzida a trimetilarsina ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>As) quando adicionado o pré-redutor, ocasionando redução na intensidade do sinal por perda por volatilização.

Para contornar este problema, foram feitas medições de uma solução de referência de 2,5 ng da espécie TMA<sub>5</sub>O sem a presença do pré-redutor. Essas medidas foram feitas para fins de comparação da sensibilidade do TMA<sub>5</sub>O com as espécies de As As(III), MMA e DMA. O perfil do sinal de absorvância obtido para o TMA<sub>5</sub>O é apresentado na Figura 16. Conforme observado, na ausência do pré-redutor L-cisteína, não foi observada redução na intensidade do sinal de absorvância para a espécie TMA<sub>5</sub>O ao longo de vários ciclos de medição.



**Figura 16.** Perfil do sinal de absorvância obtido para uma solução padrão de referência de 2,5 ng de As na forma de TMA<sub>5</sub>O (em preto) na ausência de L-cisteína. O sinal de fundo obtido está representado em vermelho.

Quando comparado o sinal de absorvância obtido para o As(III), MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O, as espécies apresentaram diferentes sensibilidades. Na Tabela 6 são apresentadas as

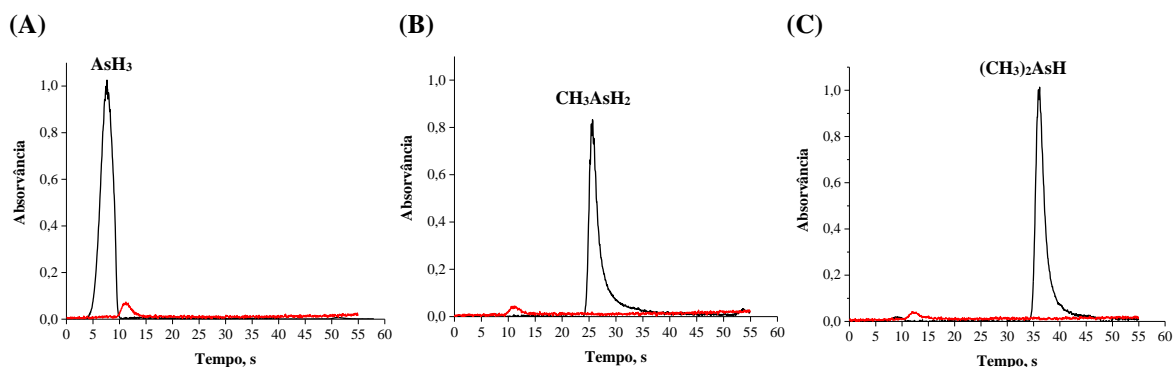
sensibilidades relativas para as espécies de As, calculadas considerando a absorvância integrada obtida para o As(III) como sendo 100%. Para avaliar a sensibilidade relativa do TMA<sub>5</sub>O, considerou-se a solução contendo a espécie na ausência do pré-redutor.

**Tabela 6.** Sensibilidades relativas, considerando a absorvância integrada do As(III) como sendo 100%, para as espécies MMA e DMA em uma solução de referência mista com 5 µg L<sup>-1</sup> de cada uma das espécies (em L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>)), e TMA<sub>5</sub>O em uma solução de referência de 5 µg L<sup>-1</sup> dessa espécie (sem adição de L-cisteína) (n=5).

Espécie	As(III)	MMA	DMA	TMA <sub>5</sub> O
<b>Absorvância integrada, abs. s</b>	2,754 ± 0,087	1,980 ± 0,092	2,337 ± 0,074	2,826 ± 0,067
<b>Sensibilidade</b>	100	71,9	84,9	103
<b>m<sub>o</sub>, pg</b>	4,0	5,6	4,7	3,9

Conforme pode ser observado na Tabela 6, não foi possível obter a mesma sensibilidade para as espécies As(III), MMA e DMA, mesmo com o emprego do pré-redutor. Esses resultados não foram concordantes com os relatados na literatura. Vários estudos relataram sensibilidades semelhantes e recuperações quantitativas para as espécies iAs, MMA e DMA quando empregado o pré-redutor L-cisteína.<sup>100,109,110,117-119</sup>

Tendo em vista essa diferença de sensibilidade, soluções de referência individuais foram preparadas na concentração de 5 µg L<sup>-1</sup> de As na forma de As(III), MMA e DMA na presença do pré-redutor L-cisteína. Essas soluções foram então analisadas por HG-CT-AAS. Essa avaliação foi feita no sentido de verificar se as soluções de referência individuais utilizadas para o preparo da solução de referência mista apresentaram interconversão, principalmente das espécies MMA e DMA em iAs. Na Figura 17 são apresentados os perfis dos sinais de absorvância obtidos após a leitura por HG-CT-AAS.



**Figura 17.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos para as soluções de referência individuais de 2,5 ng de As como As(III) (A), MMA (B) e DMA (C) (em preto), na presença de L-cisteína 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ). O sinal de fundo obtido está representado em vermelho.

Os valores de absorvância integrada para as espécies de As como As(III), MMA e DMA foram  $2,794 \pm 0,048$ ;  $1,955 \pm 0,018$  e  $2,354 \pm 0,018$  abs.s, respectivamente. Isso equivale a  $m_0$ , respectivamente, de 4,0; 5,6 e 4,7 pg para o As(III), MMA e DMA. Ainda conforme a Figura 17, não foram observados sinais de absorvância para outras espécies de As além das adicionadas à solução, ou seja, não foi observada a conversão das espécies orgânicas MMA ou DMA na espécie inorgânica de As.

Como mencionado no item 4.2, as soluções de referência para as espécies As(III) e DMA foram preparadas a partir da dissolução de seus respectivos sais. Com isso, a padronização das soluções para as espécies As(III), MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O em relação à solução de referência comercial de As se fez necessária. Foram então preparadas as soluções de referência de cada espécie de As e analisadas por GF AAS e ICP-MS para quantificação do As total. De acordo com os resultados para quantificação de As total nas soluções de referência das diferentes espécies químicas avaliadas, não houve diferença significativa entre a concentração nominal e a concentração calculada após a etapa de quantificação (teste *t* com intervalo de confiança de 95%).

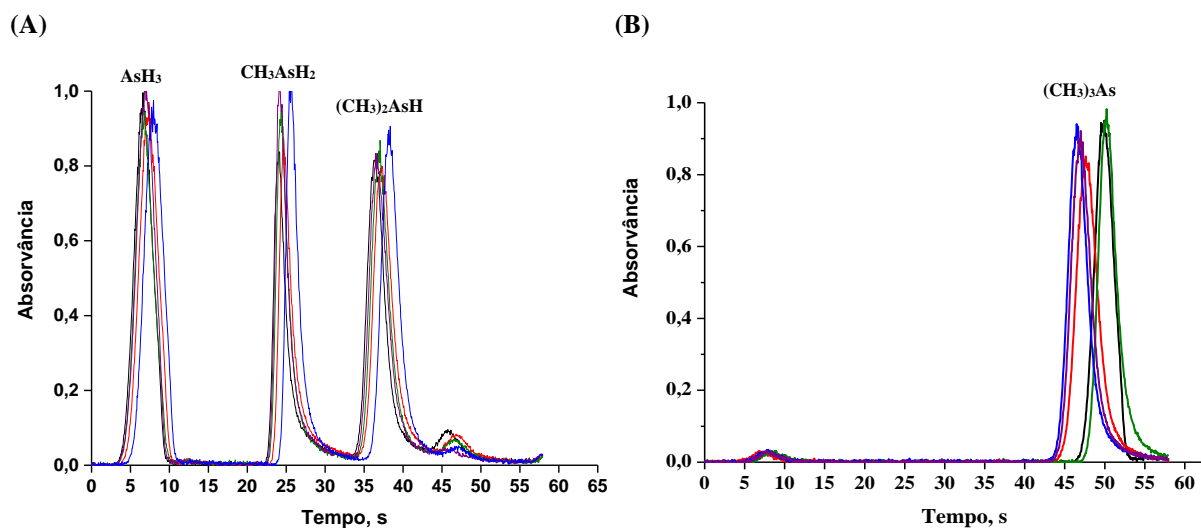
Uma vez que os resultados indicaram que realmente há uma diferença de sensibilidade para o iAs, MMA, DMA e TMA<sub>2</sub>O é possível inferir, que essa diferença de sensibilidade esteja associada à eficiência de geração da reação de redução para cada uma das espécies químicas estudadas. Assim, quando utilizado o sistema HG-CT-AAS foi necessário a



construção de curvas de calibração para cada uma das espécies de As avaliadas nesse trabalho (iAs, MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O).

### 5.1.3 Avaliação da precisão do método

A precisão do método foi avaliada a partir de 5 medidas consecutivas de uma solução de referência de 5,0 µg L<sup>-1</sup> (2,5 ng As) de As(III), MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O. Foram avaliadas as áreas integradas dos sinais de absorvância para cada espécie de As e analisada a repetibilidade das mesmas. Sinais de absorvância integrada de  $2,754 \pm 0,084$ ,  $1,980 \pm 0,092$ ,  $2,337 \pm 0,074$  e  $2,826 \pm 0,066$  abs.s foram obtidos para o As(III), MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O, respectivamente. Os desvios padrão relativos foram menores que 5%. Como é possível observar na Figura 18, pequenos deslocamentos nos tempos de eluição das espécies As(III), MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O foram observados (na ordem de 2 s). Esse comportamento entre as leituras já era esperado, uma vez que o tempo de permanência do tubo em “U” no *dewar* para a etapa de aprisionamento das espécies, bem como o aquecimento do tubo foram realizados manualmente. Sendo assim, pequenas variações no tempo de imersão e aquecimento do tubo são inerentes ao processo manual de operação do sistema.



**Figura 18.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos a partir de cinco medidas consecutivas de uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de As(III), MMA e DMA na presença de L-cisteína 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (A) e contendo 2,5 ng As na forma de TMAOs na ausência do pré-redutor (B).

A precisão e repetitividade foi também avaliada em cinco dias diferentes, utilizando uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de As(III), MMA, DMA e TMAOs. Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos para esse estudo. Os resultados em absorvância integrada apresentaram desvio padrão relativo inferior a 7,5%.

**Tabela 7.** Estudo da precisão e repetitividade do método de especiação química de As por HG-CT-AAS realizado em cinco dias diferentes (n=25), usando uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de As(III), MMA e DMA na presença de L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>) e uma solução de referência de 2,5 ng As na forma de TMA<sub>5</sub>O na ausência do pré-redutor.

	<b>Absorvância integrada, abs. s</b>			
	<b>As(III)</b>	<b>MMA</b>	<b>DMA</b>	<b>TMA<sub>5</sub>O</b>
<b>Dia 1</b>	2,754 ± 0,084	1,980 ± 0,092	2,337 ± 0,074	2,826 ± 0,066
<b>Dia 2</b>	2,770 ± 0,046	1,963 ± 0,057	2,366 ± 0,053	2,882 ± 0,058
<b>Dia 3</b>	2,752 ± 0,058	1,957 ± 0,044	2,353 ± 0,056	2,877 ± 0,067
<b>Dia 4</b>	2,735 ± 0,065	1,991 ± 0,058	2,381 ± 0,058	2,871 ± 0,084
<b>Dia 5</b>	2,730 ± 0,043	1,993 ± 0,053	2,371 ± 0,049	2,882 ± 0,058
<b>Média</b>	2,748 ± 0,136	1,977 ± 0,141	2,362 ± 0,131	2,868 ± 0,150
<b>RSD</b>	4,9	7,1	5,5	5,2

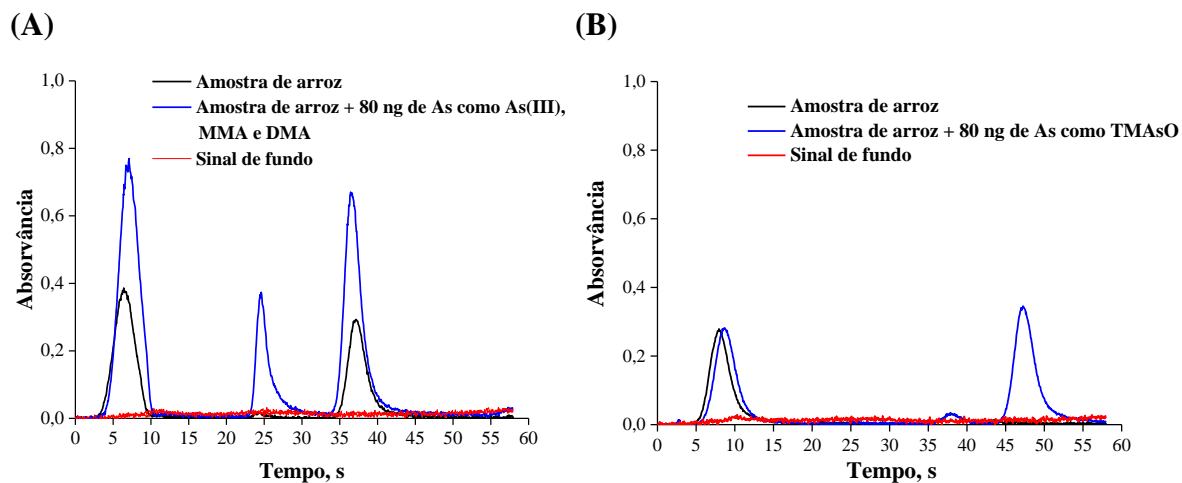
Levando em consideração os resultados obtidos, é possível afirmar que as medições feitas por HG-CT-AAS podem ser consideradas precisas para quantificação das espécies iAs, MMA, DMA e TMA<sub>5</sub>O.

## 5.2 Avaliação do procedimento de extração das espécies de As no arroz

Após otimização do sistema HG-CT-AAS, foi avaliada a extração das espécies de As no arroz mediante o emprego de uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup>. O procedimento, proposto por Huang e colaboradores<sup>2</sup>, foi selecionado uma vez que se trata de um método recomendado pela FDA para a extração de espécies de As presentes no arroz.<sup>78</sup> Ainda, segundo os autores, o emprego de HNO<sub>3</sub> em concentrações na faixa de 0,28 a 0,7 mol L<sup>-1</sup> garante a total integridade das espécies de As durante o procedimento de extração.

No sentido de avaliar a estabilidade das espécies de As durante a etapa de extração, o teste de adição e recuperação do analito foi feito com base no recomendado pela FDA.<sup>120</sup> Para isso, uma solução de referência contendo 80 ng de As na forma de As(III), MMA, DMA e

TMA<sub>5</sub>O foi adicionada a uma amostra selecionada aleatoriamente. Na Figura 19 são apresentados os perfis dos sinais de absorvância para as diferentes espécies de As em arroz e para o ensaio de recuperação.



**Figura 19.** Perfis dos sinais de absorvância obtidos para as espécies de As presentes na amostra de arroz (em preto) e para o ensaio de recuperação das espécies de As (azul) mediante HG-CT-AAS (A) na presença e (B) na ausência de L-cisteína 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ). O sinal de fundo obtido está representado em vermelho.

Conforme é possível observar na Figura 19 foram detectadas as espécies inorgânicas de As, As(III) e As(V), e DMA na amostra de arroz analisada, sendo o iAs presente em maior proporção. As concentrações obtidas para as espécies de As presentes na amostra de arroz avaliada são apresentadas na Tabela 8, bem como os resultados obtidos no ensaio de recuperação.

**Tabela 8.** Recuperações das espécies de As adicionadas a uma amostra de arroz anteriormente à etapa de extração. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

<b>Espécie</b>	<b>Adicionado, ng g<sup>-1</sup></b>	<b>Encontrado, ng g<sup>-1</sup></b>	<b>Recuperação, %</b>
iAs	0	92,4 ± 2,0	102 ± 2
	80	176 ± 5	
MMA	0	-	99 ± 1
	80	79,5 ± 0,9	
DMA	0	67,3 ± 3,6	100 ± 4
	80	147 ± 2	
TMAOs	0	-	94 ± 6
	80	75,1 ± 5,3	

O somatório das espécies de As quantificadas na amostra ( $160 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$ ) foi comparado ao conteúdo de As total determinado por HG-AAS após extração com a mistura oxidante  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HNO}_3$  ( $163 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$ ) e não apresentaram diferença estatística a um nível de confiança de 95% (teste  $t - t$  calculado: -0,429;  $t$  crítico: 0,742; 2 graus de liberdade). Como observado na Tabela 8, as recuperações foram quantitativas para o ensaio de adição e recuperação do analito. As recuperações das espécies adicionadas à amostra antes da etapa de extração foram de 102, 99, 100 e 94% para o iAs, MMA, DMA e TMAOs, respectivamente.

Vale destacar que, como observado na Figura 19, é possível a detecção seletiva das espécies inorgânicas de As, As(III) e iAs, sem e com a adição de pré-redutor, respectivamente. O As(V) pode ser estimado por diferença entre as concentrações de iAs e As(III). Dessa forma, na amostra analisada, as concentrações de As(III) e As(V) foram de  $63,5 \pm 1,5$  e  $28,9 \pm 2,5 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. Contudo, no presente trabalho levou-se em consideração somente o conteúdo de iAs (As(III) + As(V)), uma vez que, segundo as legislações vigentes, somente o conteúdo total de iAs é monitorado.

Esses resultados indicam que a solução  $\text{HNO}_3$   $0,28 \text{ mol L}^{-1}$  pode ser empregada para a extração das espécies de iAs, MMA, DMA e TMAOs no arroz, garantindo a total integridade das mesmas nas condições utilizadas.

### 5.3 Determinação de As total no arroz

Para a extração do As total no arroz foi utilizado o procedimento otimizado em um trabalho anterior, com o uso de uma mistura oxidante de  $K_2S_2O_8$  e  $HNO_3$  para total conversão das espécies de As à As(V).<sup>105</sup> A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para a determinação de As total nas amostras de arroz selecionadas para o presente estudo. Conforme é possível observar, as concentrações de As total variaram de valores abaixo do LOQ até  $1511 \text{ ng g}^{-1}$ , com uma concentração média de  $212 \text{ ng g}^{-1}$ .

**Tabela 9.** Concentração de As total nas amostras de arroz mediante HG-AAS. Os resultados são reportados como a média e o desvio padrão de três determinações ( $n = 3$ ).

<b>Tipo de Arroz</b>	<b>As Total (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>
<b>Arroz Branco</b>	
Branco 1	$103 \pm 2$
Branco 2	$216 \pm 9$
Branco 3	$83,6 \pm 2,6$
Branco 4	$< 28,6^*$
Branco 5	$94,5 \pm 7,2$
Branco 6	$175 \pm 7$
Branco 7	$139 \pm 14$
Branco 8	$71,0 \pm 1,3$
Branco 9	$194 \pm 9$
Branco 10	$671 \pm 33$
Parboilizado Branco 1	$151 \pm 16$
Parboilizado Branco 2	$103 \pm 5$
Parboilizado Branco 3	$140 \pm 11$
Parboilizado Branco 4	$162 \pm 5$
Orgânico Branco 1	$253 \pm 18$
Orgânico Branco 2	$209 \pm 18$
Orgânico Branco 3	$140 \pm 6$
Orgânico Branco 4	$136 \pm 8$

Orgânico Branco 5	91,2 ± 8,1
Orgânico Branco 6	288 ± 2
<hr/>	
<b>Arroz Integral</b>	
Integral 1	93,2 ± 11,3
Integral 2	121 ± 5
Integral 3	132 ± 10
Integral 4	158 ± 13
Integral 5	171 ± 19
Integral 6	< 28,6*
Integral 7	267 ± 10
Integral 8	151 ± 15
Integral 9	96,8 ± 8,6
Integral 10	184 ± 19
Integral 11	491 ± 35
Integral 12	206 ± 7
<hr/>	
Parboilizado Integral 1	133 ± 2
Parboilizado Integral 2	172 ± 10
Parboilizado Integral 3	106 ± 3
Parboilizado Integral 4	117 ± 9
<hr/>	
Orgânico Integral 1	93,1 ± 9,7
Orgânico Integral 2	215 ± 12
Orgânico Integral 3	278 ± 6
<hr/>	
<b>Arroz Gastronômico</b>	
Arbóreo 1	146 ± 6
Arbóreo 2	426 ± 32,3
Arbóreo 3	123 ± 7
Arbóreo 4	1511 ± 48
<hr/>	
Basmati	< 28,6*
<hr/>	
Jasmine 1	365 ± 30
Jasmine 2	< 28,6*
<hr/>	
Preto 1	359 ± 23
<hr/>	

Preto 2	< 28,6*
Preto 3	75,5 ± 4,3
Vermelho 1	220 ± 8
Vermelho 2	60,8 ± 8,1
Selvagem	73,6 ± 2,8
Sushi	216 ± 9

\* LOQ do As total.

Quando comparadas as concentrações de As total nas amostras de arroz Branco e Integral, de acordo com a análise estatística (teste *t*) não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos (*t* calculado: -0,097; *t* crítico: 2,110; 17 graus de liberdade). Como observado na Tabela 9, há uma grande variação no teor de As total entre as amostras analisadas, obtendo-se um grande desvio entre as mesmas. Com isso, no sentido de verificar uma possível diferenciação entre a concentração de As total nas amostras de arroz Branco e Integral, o teste estatístico de Grubbs foi aplicado para verificar a presença de valores *outliers*. O teste de Grubbs, é similar ao teste de Dixon, porém é considerado mais robusto no qual ao invés de comparar o valor suspeito com os demais valores do conjunto de dados, é feita a comparação entre o valor suspeito e a média do conjunto de dados.<sup>121</sup> Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos pelo teste de Grubbs para os diferentes grupos de amostras de arroz avaliados. Verificou-se, com 95% de confiança, a presença de valores *outliers* no grupo de amostras de arroz Branco e arroz Integral, visto que os valores de  $G_{\text{estatístico}}$  obtidos foram superiores aos valores de  $G_{\text{crítico}}$ . Segundo o teste estatístico, as amostras Branco 10 e Integral 11 apresentaram diferenças significativas com relação às concentrações encontradas para o restante do grupo. Já para os outros grupos de amostras, nenhuma diferença significativa foi observada.



**Tabela 10.** Resultados do teste de Grubbs (valores de G) para verificação de presença de amostras com valores outliers.

<b>Tipo de Arroz</b>	<b>G<sub>estatístico</sub></b>	<b>G<sub>Crítico</sub></b>	<b>n</b>
Branco	2,609	2,215	10
Parboilizado Branco	1,405	1,481	4
Orgânico Branco	1,336	1,887	6
Integral	2,698	2,355	12
Parboilizado Integral	1,385	1,481	4
Orgânico Integral	1,088	1,154	3

Posteriormente à remoção dessas amostras com valores *outliers*, a concentração média encontrada para As total após determinação por HG-AAS nas amostras de arroz Branco, Parboilizado Branco e Orgânico Branco foi de  $134 \pm 55$ ;  $139 \pm 25$  e  $186 \pm 76$  ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Já para amostras de arroz Integral, Parboilizado Integral e Orgânico Integral, a concentração média de As total foi de  $158 \pm 53$ ;  $132 \pm 29$  e  $195 \pm 94$  ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

As concentrações de As total nas amostras de arroz Integral e arroz Branco foram então comparadas e, de acordo com a análise estatística (teste *t*) com um nível de confiança de 95%, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos (*t* calculado: -1,77; *t* crítico: 2,26; 9 graus de liberdade). Esse resultado está em discordância com os relatados em trabalhos publicados a respeito do assunto, nos quais são citados uma maior tendência de acúmulo de As no arroz integral.<sup>4,48,49</sup> Em estudo realizado por Batista e colaboradores<sup>4</sup> em amostras de arroz brasileiras, maior concentração de As foi encontrada no arroz integral (concentração média de 348 ng g<sup>-1</sup>), seguido do arroz parboilizado branco (concentração média de 266) e arroz branco (concentração média de 215 ng g<sup>-1</sup>).

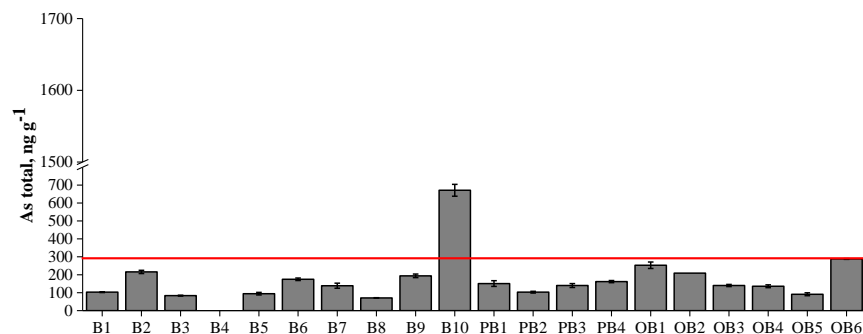
O As total também foi determinado nas amostras de arroz Gastronômico. As amostras de arroz gastronômico Arbóreo 2, Arbóreo 4, Jasmine 1 e Preto 1 apresentaram concentrações consideráveis de As e, embora seu consumo seja baixo, o monitoramento dos níveis de As também deve ser considerado nesse tipo de arroz, com foco na segurança alimentar.

Os resultados obtidos para As total foram comparados ao limite máximo tolerável para As total no arroz (Figura 20), estabelecido pela ANVISA (300 ng g<sup>-1</sup>).<sup>66</sup> As amostras Branco

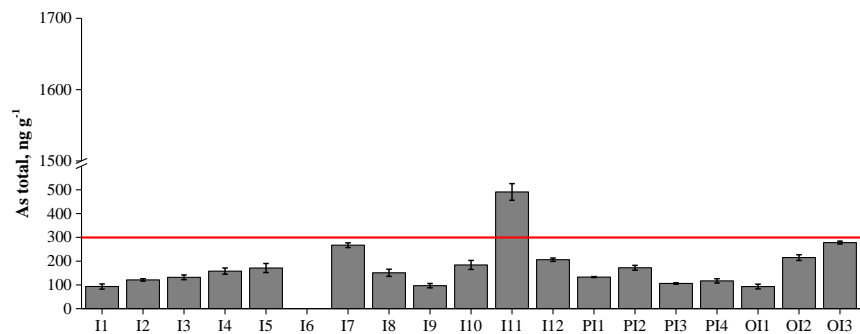
10, Integral 11, Arbóreo 2, Arbóreo 4, Jasmine 1 e Preto 1 apresentaram valores superiores ao limite preconizado pela legislação brasileira, com concentrações de As total de  $671 \pm 33$ ;  $491 \pm 35$ ;  $426 \pm 32$ ;  $1511 \pm 48$ ;  $365 \pm 30$  e  $359 \pm 23$  ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Quando comparadas as amostras cultivadas de forma tradicional, com as de forma orgânica, não foram observadas diferenças significativas (nível de confiança de 95%) nas amostras de arroz branco e integral, assim como foi observado por Poletti e colaboradores<sup>122</sup> e Segura e colaboradores<sup>56</sup>. Apesar do arroz orgânico ser obtido através de uma cultura livre de insumos químicos, os resultados obtidos indicam que a presença do As no arroz não está relacionada somente ao uso de praguicidas e fertilizantes químicos, mas também com as características do solo utilizado para cultivo da planta.

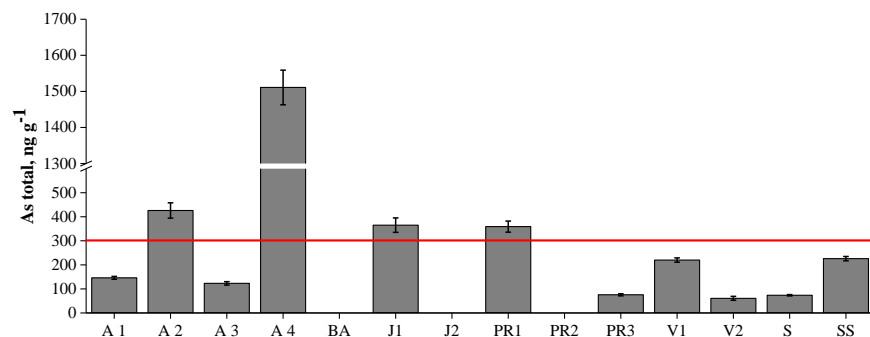
(A)



(B)



(C)



**Figura 20.** Concentração de As total, em  $\text{ng g}^{-1}$ , entre as amostras classificadas por grupos de (A) arroz Branco ( $n=20$ ), (B) arroz Integral ( $n=19$ ) e (C) arroz Gastronômico ( $n=14$ ) e a comparação quanto ao limite máximo de As total preconizado pela legislação brasileira ( $300 \text{ ng g}^{-1}$ ). Legenda: B, arroz Branco; PB, arroz Parboilizado Branco; OB, arroz Orgânico Branco; I, arroz Integral; PI, arroz Parboilizado Integral; OI, arroz Orgânico Integral; A, arroz Arbóreo; BA, arroz Basmati; J, arroz Jasmine; PR, arroz Preto; V, arroz Vermelho; S, arroz Selvagem, SS, arroz para Sushi.

#### **5.4 Determinação das espécies de As no arroz**

As espécies de As presentes nas amostras de arroz selecionadas no estudo foram quantificadas por HG-CT-AAS, cujos resultados da análise de especiação química de As são apresentados na Tabela 11. A soma das concentrações das espécies de As encontradas após o procedimento de extração foram comparadas ao teor de As total (balanço de massa) para o cálculo das recuperações.

**Tabela 11.** Concentração das espécies de As encontradas nas amostras de arroz mediante HG-CT-AAS. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

Tipo de Arroz	HG-CT-AAS				HG-AAS
	iAs (ng g <sup>-1</sup> )	MMA (ng g <sup>-1</sup> )	DMA (ng g <sup>-1</sup> )	∑ espécies de As(ng g <sup>-1</sup> )	As Total(ng g <sup>-1</sup> )
<b>Arroz Branco</b>					
Branco 1	51,2 ± 1,0	< 8,75 *	51,7 ± 3,0	103 ± 3	103 ± 2
Branco 2	108 ± 1	< 8,75 *	95,7 ± 5,6	204 ± 6	216 ± 9
Branco 3	39,4 ± 5,4	< 8,75 *	32,2 ± 1,5	71,6 ± 5,6	83,6 ± 2,6
Branco 4	< 7,83 *	< 8,75 *	< 5,41 *	-	< 28,6*
Branco 5	48,1 ± 1,4	< 8,75 *	39,3 ± 3,3	87,4 ± 3,6	94,5 ± 7,2
Branco 6	89,6 ± 3,4	< 8,75 *	90,2 ± 6,1	180 ± 7	175 ± 7
Branco 7	56,1 ± 2,1	< 8,75 *	83,5 ± 3,4	139 ± 4	139 ± 14
Branco 8	69,4 ± 6,8	< 8,75 *	18,0 ± 0,4	87,4 ± 7,0	71,0 ± 1,3
Branco 9	47,6 ± 1,2	< 8,75 *	152 ± 1	200 ± 1	194 ± 9
Branco 10	56,2 ± 1,3	< 8,75 *	601 ± 10	658 ± 10	671 ± 33
Parboilizado Branco 1	77,0 ± 1,0	< 8,75 *	62,1 ± 5,2	139 ± 5	151 ± 16
Parboilizado Branco 2	70,2 ± 3,1	< 8,75 *	36,7 ± 0,5	107 ± 3	103 ± 5
Parboilizado Branco 3	89,2 ± 1,0	< 8,75 *	44,8 ± 2,4	134 ± 3	140 ± 11
Parboilizado Branco 4	106 ± 4	< 8,75 *	55,0 ± 4,8	161 ± 6	162 ± 5
Orgânico Branco 1	162 ± 8	< 8,75 *	87,0 ± 0,7	249 ± 8	253 ± 18

Orgânico Branco 2	155 ± 12	< 8,75 *	37,9 ± 2,6	193 ± 12	209 ± 18
Orgânico Branco 3	77,3 ± 2,1	< 8,75 *	67,7 ± 2,4	145 ± 3	140 ± 6
Orgânico Branco 4	61,4 ± 2,9	< 8,75 *	63,4 ± 6,0	125 ± 7	136 ± 8
Orgânico Branco 5	63,3 ± 1,5	< 8,75 *	15,2 ± 0,2	78,5 ± 1,5	91,2 ± 8,1
Orgânico Branco 6	136 ± 1	< 8,75 *	149 ± 6	285 ± 6	288 ± 2

---



---

### Arroz Integral

---

Integral 1	68,7 ± 2,7	< 8,75 *	17,5 ± 0,8	86,2 ± 2,8	93,2 ± 11,3
Integral 2	99,8 ± 6,0	< 8,75 *	18,0 ± 0,9	118 ± 6	121 ± 5
Integral 3	88,1 ± 0,4	< 8,75 *	37,5 ± 0,9	125 ± 1	132 ± 10
Integral 4	107 ± 10	< 8,75 *	44,0 ± 4,4	151 ± 11	158 ± 13
Integral 5	100 ± 1	< 8,75 *	67,6 ± 3,7	168 ± 4	171 ± 19
Integral 6	24,6 ± 1,9	< 8,75 *	< 5,41 *	24,6 ± 1,9	< 28,6*
Integral 7	113 ± 9	< 8,75 *	132 ± 7	246 ± 12	267 ± 10
Integral 8	105 ± 7	< 8,75 *	67,0 ± 2,7	172 ± 8	151 ± 15
Integral 9	68,3 ± 5,2	< 8,75 *	32,0 ± 1,0	100 ± 5	96,8 ± 8,6
Integral 10	106 ± 9	< 8,75 *	63,8 ± 5,0	169 ± 10	184 ± 19
Integral 11	138 ± 7	< 8,75 *	403 ± 2	541 ± 7	491 ± 35
Integral 12	115 ± 5	< 8,75 *	77,6 ± 3,5	193 ± 6	206 ± 7
Parboilizado Integral 1	97,7 ± 5,6	< 8,75 *	39,4 ± 0,9	137 ± 6	133 ± 2
Parboilizado Integral 2	112 ± 3	< 8,75 *	76,9 ± 3,3	189 ± 5	172 ± 10
Parboilizado Integral 3	71,9 ± 7,4	< 8,75 *	31,3 ± 3,3	103 ± 8	106 ± 3

Parboilizado Integral 4	83,2 ± 3,4	< 8,75 *	30,9 ± 3,8	114 ± 5	117 ± 9
Orgânico Integral 1	81,7 ± 1,9	< 8,75 *	17,7 ± 1,3	99,4 ± 2,3	93,1 ± 9,7
Orgânico Integral 2	127 ± 4	< 8,75 *	91,1 ± 1,7	218 ± 5	215 ± 12
Orgânico Integral 3	144 ± 1	< 8,75 *	105 ± 3	249 ± 3	278 ± 6
<b>Arroz Gastronômico</b>					
Arbóreo 1	102 ± 5	< 8,75 *	42,0 ± 0,1	144 ± 5	146 ± 6
Arbóreo 2	84,0 ± 2,9	< 8,75 *	256 ± 7	340 ± 7	426 ± 32
Arbóreo 3	71,3 ± 0,1	< 8,75 *	52,4 ± 3,0	124 ± 3	123 ± 7
Arbóreo 4	39,2 ± 4,5	< 8,75 *	1414 ± 64	1453 ± 65	1511 ± 48
Basmati	26,9 ± 5,7	< 8,75 *	< 5,41 *	26,9 ± 5,7	< 28,6*
Jasmine 1	89,5 ± 5,5	< 8,75 *	215 ± 10	304 ± 11	365 ± 30
Jasmine 2	14,1 ± 2,1	< 8,75 *	< 5,41 *	14,1 ± 2,2	< 28,6*
Preto 1	111 ± 7	< 8,75 *	215 ± 3	326 ± 7	359 ± 23
Preto 2	34,8 ± 2,6	< 8,75 *	7,76 ± 0,76	42,6 ± 2,7	< 28,6*
Preto 3	51,6 ± 1,4	< 8,75 *	16,2 ± 0,3	67,8 ± 1,5	75,5 ± 4,3
Vermelho 1	143 ± 8	< 8,75*	78,5 ± 1,5	221 ± 8	220 ± 8
Vermelho 2	39,3 ± 1,5	< 8,75*	9,79 ± 0,88	49,1 ± 1,8	60,8 ± 8,1
Selvagem	66,1 ± 2,8	< 8,75 *	11,6 ± 0,5	77,8 ± 2,9	73,6 ± 2,8
Sushi	76,4 ± 1,8	< 8,75 *	132 ± 2	208 ± 3	216 ± 9

\*LOQs, em ng g<sup>-1</sup>: iAs:7,83; MMA: 8,75; DMA: 5,41; As total: 28,6.

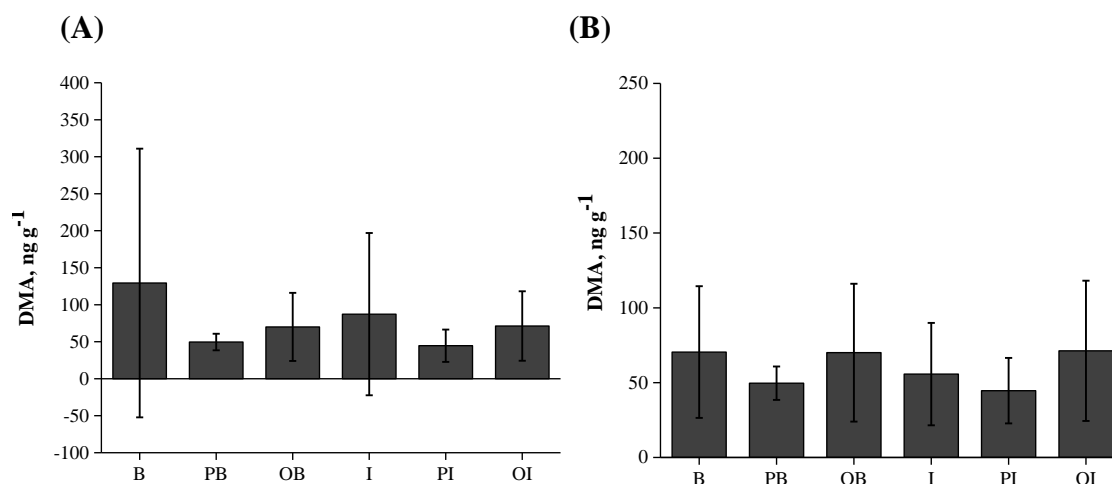
Conforme é possível observar na Tabela 11, concordâncias de 80 a 123% foram obtidas quando comparados o somatório das espécies de As encontradas nas amostras de arroz utilizando HG-CT-AAS em relação ao conteúdo de As total determinado por HG-AAS (balanço de massa). Quando aplicado o teste *t* pareado, não houve diferença significativa entre o somatório das espécies de As e a concentração de As total encontradas nas amostras de arroz Branco (*t* calculado: -1,919; *t* crítico: 2,101; 18 graus de liberdade) e Integral (*t* calculado: -0,0613; *t* crítico: 2,110; 17 graus de liberdade), com nível de confiança de 95%. Contudo, quando aplicado o teste *t* pareado para as amostras de arroz gastronômico uma diferença significativa foi obtida comparando-se os o somatório das espécies de As e o conteúdo de As total (*t* calculado: 2,512; *t* crítico: 2,179; 12 graus de liberdade). A respeito das espécies de As encontradas nas amostras de arroz após análise de especificação química por HG-CT-AAS, as espécies iAs e DMA foram as formas detectadas. A espécie MMA apresentou concentração inferior ao LOQ do método em todas as amostras analisadas. A ausência da espécie MMA já era esperada, uma vez que conforme relatado em outros trabalhos na literatura, o MMA não é comumente detectado no arroz.<sup>3,14,52,55</sup> Em estudo realizado pela FDA, de 1300 amostras de arroz analisadas o MMA foi detectado em 97%, com concentrações inferiores a 13 ng g<sup>-1</sup>.<sup>55</sup> Em outro estudo, das 32 amostras de arroz avaliadas por Petursdottir e colaboradores<sup>52</sup>, a espécie MMA foi detectada somente em 13 delas, cuja concentração máxima foi de 7,2 ng g<sup>-1</sup>. Contudo, Batista e colaboradores<sup>4</sup> quantificaram o MMA em 23 amostras de arroz produzidas no Brasil (n=54), cuja concentração variou de 6,0 ± 1,4 a 29,3 ± 8,9 ng g<sup>-1</sup>, o que representou até 3,7% da concentração de As total.

O iAs representou de 47 a 69% da concentração total de As presente nas amostras de arroz avaliadas neste estudo. A concentração média de iAs nas amostras de arroz Branco, Parboilizado Branco e Orgânico Branco foi de 63,0 ± 22,7; 85,6 ± 15,7 e 109 ± 47 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, nas amostras de arroz Integral, Parboilizado Integral e Orgânico Integral, as concentrações médias para iAs foram similares, 94,5 ± 29,2; 91,2 ± 17,4 e 118 ± 33 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Nenhuma das amostras analisadas apresentaram teores de iAs acima dos limites máximos estabelecidos pela UE (200 ng g<sup>-1</sup> para arroz Branco; 250 ng g<sup>-1</sup> para arroz Parboilizado)<sup>65</sup> e CODEX ALIMENTARIUS (200 ng g<sup>-1</sup> para arroz Branco; 350 ng g<sup>-1</sup> para arroz Integral)<sup>123</sup>. Contudo, vale ressaltar que as amostras de arroz



Orgânico Branco 1 e 2 apresentaram resultados acima do limite máximo de iAs estabelecido pela ANVISA, de  $150 \text{ ng g}^{-1}$ , para cereais destinados a alimentos infantis.<sup>67</sup>

Com relação ao DMA, a espécie orgânica representou de 31 a 53% da concentração de As total presente no arroz, dentre aquelas amostras avaliadas no presente estudo. A concentração média de DMA encontrada foi de  $129 \pm 182$ ;  $49,7 \pm 11,2$ ;  $70,0 \pm 46,0$ ;  $87,3 \pm 109,7$ ;  $44,6 \pm 21,9$  e  $71,3 \pm 46,9 \text{ ng g}^{-1}$  para as amostras de arroz Branco, Parboilizado Branco, Orgânico Branco, Integral, Parboilizado Integral e Orgânico Integral, respectivamente. Conforme é possível observar na Figura 21, uma grande variação no teor de DMA, principalmente para as amostras de arroz Branco e arroz Integral, foram observadas, obtendo-se um grande desvio. Com isso, o teste estatístico de Grubbs foi aplicado, no sentido de verificar a presença de *outliers*. Segundo o teste estatístico, as amostras que apresentaram diferenças significativas foram: Branco 10 ( $G_{\text{estatístico}} 2,597$  e  $G_{\text{crítico}} 2,215$ ;  $n=19$ ) e Integral 11 ( $G_{\text{estatístico}} 2,880$  e  $G_{\text{crítico}} 2,355$ ;  $n=18$ ). Realizada a remoção dessas amostras classificadas como *outliers*, a concentração média encontrada para DMA nas amostras de arroz Branco e Integral foi de  $70,5 \pm 43,8$  e  $55,7 \pm 34,2 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. No presente estudo, as amostras de arroz com concentração de As total acima do permitido pela legislação brasileira ( $300 \text{ ng g}^{-1}$ )<sup>66</sup> foram aquelas com maiores concentrações de DMA. Com isso, pode-se concluir que a concentração de As total não é o único parâmetro para avaliar o risco de contaminação com relação ao consumo de arroz, uma vez que esse resultado poderá ser relacionado de forma errônea com a concentração de iAs, espécie química de maior potencial toxicológico.

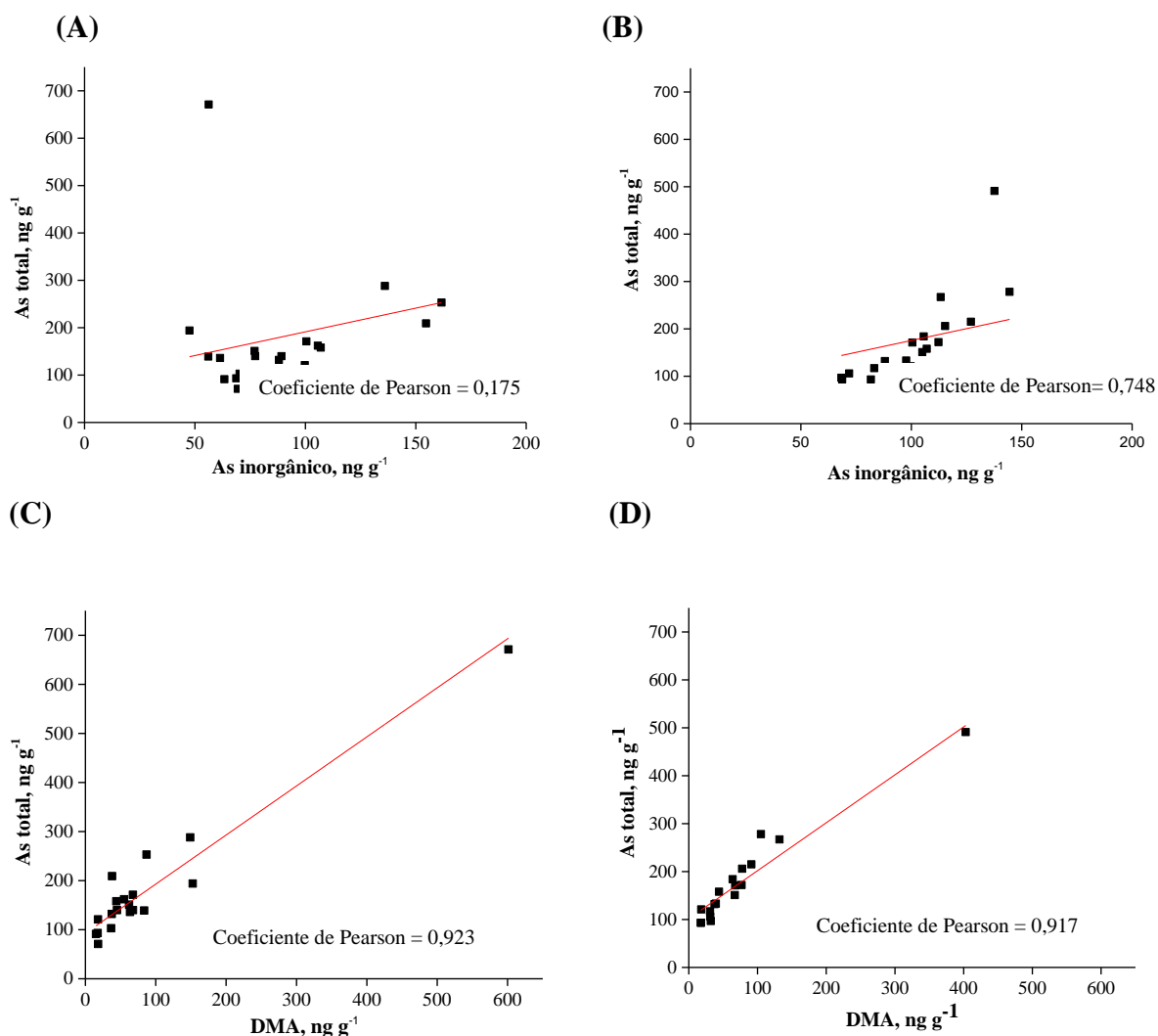


**Figura 21.** Concentração média da espécie DMA encontrada nas amostras de arroz antes **(A)** e depois **(B)** da aplicação do teste estatístico de Grubbs. Legenda: B, arroz Branco; PB, arroz Parboilizado Branco; OB, arroz Orgânico Branco; I, arroz Integral; PI, arroz Parboilizado Integral; OI, arroz Orgânico Integral.

Os resultados obtidos no presente trabalho são condizentes com os relatados em trabalhos anteriores em relação à contribuição de cada espécie de As frente ao teor total de As. Em um estudo realizado em amostras de arroz de Bangladesh e de produtos à base de arroz, o iAs representou cerca de 70% do As total.<sup>5,124</sup> Em outro trabalho publicado, foi reportado que a concentração de iAs variou de 38 a 58% e de 26 a 84% do As total em amostras de arroz da Itália e do Reino Unido, respectivamente.<sup>3,52</sup> Batista e colaboradores<sup>4</sup> observaram que as espécies iAs e DMA representaram, respectivamente, de 50 a 60% e de 40 a 50% da concentração total de As nas amostras de arroz brasileiras. Segura e colaboradores<sup>56</sup> verificaram comportamento similar, no qual o iAs representou de 39 a 56% do teor total de As nas amostras produzidas no Brasil, enquanto a espécie DMA representou de 44 a 61%. Ainda, em trabalho realizado por Kato e colaboradores<sup>15</sup>, cerca de 71% do As presente em amostras de arroz brasileiras encontrava-se na forma de iAs.

Com o objetivo de comparar os valores de concentração obtidos para iAs, DMA e As total nas amostras analisadas, foram feitos testes de correlação para testar a dependência das espécies de As em relação ao As total presente no grão do arroz. Para isso, avaliou-se a correlação de Pearson. Para os testes, foi assumido um intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 22. Conforme observado em (A) e (B) na

Figura 22, existe uma fraca correlação entre as concentrações de iAs e As total para amostras de arroz Branco e arroz Integral. Por outro lado, para a espécie DMA, o coeficiente de Pearson para as amostras de arroz Branco e arroz Integral foi de 0,923 e 0,917, respectivamente, revelando uma forte correlação entre as concentrações de DMA e de As total. Isso demonstra que, para as amostras analisadas no presente estudo, a concentração da espécie DMA tende a aumentar juntamente com o conteúdo total de As. Esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos por Meharg e colaboradores<sup>125</sup>, no qual os autores observaram uma interação não significativa entre os teores de iAs e de As total. Por outro lado, uma forte correlação positiva foi obtida entre os teores de As total e da espécie DMA. Para Segura e colaboradores<sup>56</sup> uma correlação positiva entre as concentrações de As total e de DMA em amostras de arroz brasileiras também foi observada.



**Figura 22.** Correlações entre as concentrações de iAs vs As total nas amostras de arroz Branco (A) e arroz Integral (B) e concentrações de DMA vs As total no arroz Branco (C) e arroz Integral (D).

O metabolismo e a translocação do As na planta do arroz podem explicar porque o teor de DMA tende a aumentar nos grãos de plantas expostas a concentrações mais elevadas de As. Apesar dos mecanismos de absorção de espécies orgânicas de As ainda serem desconhecidos, Raab e colaboradores<sup>126</sup> observaram que a translocação dos compostos metilados de As é mais eficiente no estágio de crescimento da planta. Os autores sugerem que esse fato pode estar associado à formação de compostos orgânicos de As de baixa afinidade com as fitoquelatinas. Ainda, os autores concluíram que quanto maior a exposição da planta

de arroz às formas orgânicas de As, maior é o teor de As total presente nos brotos da planta de arroz.

## 5.5 Concentrações das espécies de As no arroz de diferentes países

Além das amostras brasileiras, sete amostras de arroz produzidas em diferentes países foram analisadas por HG-CT-AAS. Posteriormente, uma comparação dos resultados obtidos com as concentrações das espécies de As encontradas no arroz brasileiro foi realizada. Os resultados são apresentados na Tabela 12. Ainda, os resultados reportados na literatura foram comparados aos resultados obtidos no presente trabalho.

Conforme é possível observar na Tabela 12, a concentração de As total variou de  $63,2 \pm 2,0$  a  $227 \pm 26$  ng g<sup>-1</sup> entre os diferentes países, no presente estudo. A concentração do iAs variou de  $33,1 \pm 2,1$  ng g<sup>-1</sup> (arroz Branco do Japão) a  $118 \pm 33$  ng g<sup>-1</sup> (arroz Orgânico Integral do Brasil). A espécie orgânica DMA variou de  $15,0 \pm 1,4$  ng g<sup>-1</sup> (arroz Integral do EUA) a  $129 \pm 182$  ng g<sup>-1</sup> (arroz Branco do Brasil). Ao comparar a concentração das espécies de As em arroz avaliados em outros trabalhos na literatura, as concentrações das espécies inorgânica, MMA e DMA variaram de  $53,2 \pm 21,6$  ng g<sup>-1</sup> (arroz Branco do Brasil) a  $188$  ng g<sup>-1</sup> (arroz integral do Brasil); <LOQ (Branco e Integral dos EUA, Jasmine da Tailândia,) a  $11$  ng g<sup>-1</sup> (Integral do Brasil); e  $30$  ng g<sup>-1</sup> (Branco do Japão e Jasmine da Tailândia) a  $173$  ng g<sup>-1</sup> (Integral do EUA), respectivamente.

Os valores encontrados no presente estudo estão em concordância com os resultados reportados na literatura para amostras de arroz produzidas na mesma região, com exceção das amostras dos EUA, onde se esperava uma proporção maior da espécie DMA sobre a espécie inorgânica de As. Um dos primeiros estudos na literatura sobre a determinação das espécies de As presentes no arroz de diferentes países foi realizado por Williams e colaboradores.<sup>127</sup> Os autores observaram que as amostras de arroz de diferentes regiões diferiam bastante entre as concentrações das espécies de As. Para o arroz produzido nos EUA e na Europa, uma alta porcentagem de DMA foi encontrada em comparação com arroz de Bangladesh e o arroz indiano. Em estudo realizado por Meharg e colaboradores,<sup>128</sup> o mesmo comportamento foi observado.

Como pode ser observado, há uma grande variação nas concentrações das espécies de As no arroz cultivado em diferentes países. Tais diferenças significativas podem estar relacionadas ao sistema de produção da cultura (sistema de várzea ou com inundação controlada) e/ou contaminação ambiental. Contudo, vários fatores também podem contribuir, como as propriedades do solo, da água utilizada na irrigação da cultura e outras características locais.

**Tabela 12.** Comparação da concentração, em ng g<sup>-1</sup>, das espécies de As nas amostras de arroz de diferente países.

País	Tipo de arroz	iAs, ng g <sup>-1</sup>	MMA, ng g <sup>-1</sup>	DMA, ng g <sup>-1</sup>	As total, ng g <sup>-1</sup>	Referência
	Branco	63,0 ± 22,7	< 8,75	129 ± 182	194 ± 186	Presente estudo
	Parboilizado Branco	85,6 ± 166	< 8,75	49,7 ± 11,2	139 ± 25	
	Orgânico Branco	109 ± 47	< 8,75	70,0 ± 46,0	186 ± 76	
	Integral	94,5 ± 29,2	< 8,75	87,3 ± 110	188 ± 112	
	Parboilizado Integral	91,2 ± 17,4	< 8,75	44,6 ± 21,9	1312 ± 29	
	Orgânico Integral	118 ± 33	< 8,75	71,3 ± 46,9	195 ± 94	
<b>Brasil</b>	Branco	112 (56 – 218) <sup>a</sup>	8 (0 – 29) <sup>a</sup>	93 (39 – 258) <sup>a</sup>	223 (109 – 376) <sup>a</sup>	Batista e Colaboradores <sup>4</sup>
	Parboilizado Branco	130 (69 – 187) <sup>a</sup>	10 (0 – 51) <sup>a</sup>	65 (17 – 139) <sup>a</sup>	215 (108 – 367) <sup>a</sup>	
	Integral	188 (176 – 202) <sup>a</sup>	11 (0 – 18) <sup>a</sup>	127 (70 – 206) <sup>a</sup>	348 (271 – 428) <sup>a</sup>	
	Parboilizado Integral	156 (132 – 198) <sup>a</sup>	6 (0 – 28) <sup>a</sup>	82 (46 – 111) <sup>a</sup>	266 (226 – 316) <sup>a</sup>	
	Branco	53 ± 22	(77 ± 28) <sup>b</sup>		137 ± 47	Segura e colaboradores <sup>56</sup>
	Orgânico Branco	72 ± 24	(73 ± 40) <sup>b</sup>		158 ± 56	
	Integral	901 ± 31	(125 ± 47) <sup>b</sup>		218 ± 61	
	Orgânico Integral	128 ± 44	(87 ± 47) <sup>b</sup>		228 ± 96	
	Integral	123 ± 26	(110 ± 85) <sup>b</sup>		174 ± 168	Kato e colaboradores <sup>15</sup>
<b>EUA</b>	Branco	94,3 ± 3,5	< 8,75	54,0 ± 2,5	161 ± 3	Presente estudo
	Integral	91,0 ± 6,3	< 8,75	15,0 ± 1,4	88,2 ± 9,8	
	Branco	103 (52 – 217) <sup>a</sup>	0,6 (0 – 6) <sup>a</sup>	155 (40 – 302) <sup>a</sup>	265 (162 – 383) <sup>a</sup>	Zavala e colaboradores <sup>41</sup>
	Integral	139 (97–181) <sup>a</sup>	1 (0 – 13) <sup>a</sup>	173 (36 – 572) <sup>a</sup>	331 (201 – 710) <sup>a</sup>	

	Branco	76 (20 – 100) <sup>a</sup>	< LOQ	77 (50 – 2 60) <sup>a</sup>	277 (170 – 400) <sup>a</sup>	Williams e colaboradores <sup>127</sup>
	Integral	105 (60 – 140) <sup>a</sup>	< LOQ	90 (10 – 150) <sup>a</sup>	225 (110 – 340) <sup>a</sup>	
<b>Tailândia</b>	Jasmine	70,3 ± 3,9	< 8,75	48,2 ± 0,1	126 ± 6	Presente estudo
	Jasmine	80	< LOQ	30	110 ± 10	Williams e colaboradores <sup>127</sup>
	Branco	168 ± 34	-	-	196 ± 35	Rahman e colaboradores <sup>129</sup>
	Jasmine	-	-	-	120 ± 40	Tinggi e colaboradores <sup>130</sup>
<b>Itália</b>	Arbóreo	113 ± 8	< 8,75	101 ± 10	227 ± 26	Presente estudo
	Carnaroli	111 ± 6	< 8,75	97,4 ± 7,9	219 ± 6	
	Arbóreo	100 ± 40	70 ± 50	230 ± 80		Somella e colaboradores <sup>3</sup>
	Carnaroli	90 ± 40	80 ± 60	230 ± 80		
	Arbóreo	80 ± 22	-	129 ± 94	208 ± 73	Maher e colaboradores <sup>131</sup>
<b>Japão</b>	Branco	33,1 ± 2,1	< 8,75	24,1 ± 1,0	63,2 ± 2,3	Presente estudo
	Branco	61	-	30	91	Maher e colaboradores <sup>131</sup>
	Branco	-	-	-	110	Tinggi e colaboradores <sup>130</sup>
<b>Uruguai</b>	Branco	65,6 ± 0,3	< 8,75	113 ± 1	193 ± 11	Presente estudo
	Branco	67,0 ± 3,0	-	-	-	Carracelas e colaboradores <sup>132</sup>

<sup>a</sup> média (mínimo-máximo)

<sup>b</sup> MMA + DMA



## 5.6 Figuras de mérito

### 5.6.1 Limites de detecção e de quantificação

Conforme relatado anteriormente no item 5.1.2, as sensibilidades obtidas para o MMA e o DMA no presente estudo foram cerca de 27 e 15% inferiores à sensibilidade obtida para o iAs, respectivamente. Por essa razão, foi necessária a construção de curvas de calibração para cada uma das espécies. Para isso, foram preparadas soluções de referência das três espécies de As (iAs, MMA e DMA) em concentrações de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas em L-cisteína 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e as medidas foram feitas uma hora após a adição do pré-redutor. Adicionalmente, a calibração para a determinação de As na forma de TMA<sub>2</sub>O foi efetuada sem a adição de L-cisteína, no sentido de evitar perdas por volatilização.

Os parâmetros de mérito para a análise de especiação de As por HG-CT-AAS em arroz estão resumidos na Tabela 13. O LOD e o LOQ foram calculados considerando-se a média dos brancos somada ao critério de três e dez vezes o desvio padrão, (3s) e (10s), respectivamente, de dez determinações consecutivas no branco analítico. Os LODs e LOQs, em  $\text{ng g}^{-1}$ , foram calculados considerando 250 mg de amostra em um volume final de 10 mL, bem como o volume de injeção de 500  $\mu\text{L}$ . Para análise de As total por HG-AAS, os mesmos parâmetros de massa e volume foram empregados no cálculo.

**Tabela 13.** Parâmetros de mérito para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS e As total por HG-AAS em amostras de arroz.

Parâmetro	iAs	MMA	DMA	TMA <sub>2</sub> O	As total
LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$ / ng	0,14 / 0,07	0,08 / 0,04	0,04 / 0,02	0,04 / 0,02	0,39 / 0,10
LOD, $\text{ng g}^{-1}$	5,83	3,20	1,62	1,42	15,59
LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$ / ng	0,20 / 0,10	0,22 / 0,11	0,14 / 0,07	0,12 / 0,06	0,72 / 0,18
LOQ, $\text{ng g}^{-1}$	7,83	8,75	5,41	4,75	28,6
Equação de regressão linear	$y=0,564x + 0,002$	$y=0,421x - 0,041$	$y=0,506x - 0,001$	$y=0,607x - 0,001$	$y=0,083x + 0,003$
Coefficiente de determinação, $R^2$	0,999	0,997	0,999	0,998	0,997

Os LODs instrumentais obtidos para iAs, MMA e DMA foram 0,07; 0,04 e 0,02 ng, respectivamente, e são da mesma ordem de grandeza daqueles reportados na literatura para o uso do sistema HG-CT-AAS.<sup>100,109,111</sup> Quando comparado os LODs instrumentais obtidos no presente trabalho e os LODs reportados por Matoušek e colaboradores<sup>100</sup>, o LOD obtido para o iAs foi cerca de 2,4 vezes inferior ao reportado pelos autores, de 0,18 ng. Ainda, segundo os autores, para as espécies MMA e DMA o LOD instrumental foi de 0,02 ng. Dessa forma, o LOD obtido para a espécie DMA no presente trabalho está em concordância com o reportado pelos autores. Contudo, para a espécie MMA, o valor obtido foi duas vezes superior. Em outro estudo que utiliza o sistema HG-CT-AAS automatizado para a análise de especiação química de As em amostras biológicas, o LOD instrumental reportado foi de 0,02 ng para o DMA, similar ao encontrado no presente trabalho.<sup>109</sup> Valores de LODs de 0,014 e 0,008 ng foram relatados para iAs e MMA, respectivamente, sendo inferiores aos alcançados nesse estudo.<sup>109</sup>

O sistema HG-CT-AAS semiautomatizado apresentou desempenho analítico satisfatório e torna possível a análise de especiação química de As em arroz, alcançando limites de detecção da mesma magnitude dos obtidos pela técnica de ICP-MS.<sup>12,61,63</sup> Em estudo realizado por Raber e colaboradores<sup>12</sup> para a determinação de iAs, MMA e DMA em amostras de arroz e tecido muscular de peixe por LC-ICP-MS, foram obtidos LODs de 1 ng g<sup>-1</sup> para iAs e 0,5 ng g<sup>-1</sup> para MMA e DMA. Signes-Pastor e colaboradores<sup>61</sup> reportaram valores de LODs de 3 ng g<sup>-1</sup> para iAs, MMA e DMA utilizando LC-ICP-MS para análise de especiação química de As em arroz e alimentos derivados de arroz. Llorente-Mirandes e colaboradores<sup>63</sup> aplicando a LC-ICP-MS para especiação de As em arroz e alimentos à base de arroz relataram valores de LODs de 3 ng g<sup>-1</sup> para iAs e DMA e 6 ng g<sup>-1</sup> para MMA.

Dessa forma, o emprego da técnica HG-CT-AAS é uma alternativa menos onerosa e de maior amplitude de alcance considerando a maior disponibilidade da técnica de espectrometria atômica. Principalmente, quando comparada à técnica cromatográfica acoplada ao ICP-MS, que são amplamente empregadas na análise de especiação química de As em arroz. Por outro lado, a técnica de HG-CT-AAS exige uma montagem instrumental complexa e requer atenção integral do operador.

### 5.6.2 Avaliação da exatidão do método

Para a extração de As no arroz para a completa conversão das espécies de As à As(V) para a determinação do As total mediante HG-AAS, a mistura  $K_2S_2O_8$  2% ( $m\ v^{-1}$ ) +  $HNO_3$  10% ( $v\ v^{-1}$ ) foi utilizada, devido à ausência do sinal analítico do As quando a solução de arroz decomposto com ácido e radiação micro-ondas foi analisada. A principal razão deste comportamento pode ser o efeito causado pelos óxidos de nitrogênio presentes na solução da amostra, os quais aumentam o sinal de fundo que não é corretamente corrigido devido à absorção da radiação da fonte pelo  $NO_{2(g)}$  presente no atomizador (espécies voláteis geradas pelo íon  $NO_2^-$  que podem ser transportados até o atomizador juntamente com o hidreto gerado).<sup>116,133,134</sup> Nesse sentido, para avaliar a eficiência da extração de As total no arroz utilizando a mistura oxidante, foram selecionadas cinco amostras de arroz de diferentes níveis de concentração de As, as quais foram submetidas ao processo de decomposição por MIC para determinação do As total mediante GF AAS. Considerando trabalhos anteriores para a decomposição e posterior determinação de As em alimentos, o emprego da MIC para a decomposição do arroz foi selecionada uma vez que a matéria orgânica é completamente oxidada, além do uso de soluções diluídas para a retenção do As permitir a análise das soluções digeridas sem uma etapa de diluição excessiva.<sup>114-116</sup> Com isso, o procedimento de decomposição por MIC e posterior determinação do As total por GF AAS foi utilizado como uma técnica independente para a avaliação do método de extração para As total empregado no presente estudo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Comparação entre as concentrações de As total, em  $\text{ng g}^{-1}$ , encontradas no arroz por HG-AAS após extração com a mistura  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e  $\text{HNO}_3$  e por GF AAS após decomposição por MIC. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações ( $n = 3$ ).

<b>Tipo de arroz</b>	<b>Extração e HG-AAS</b>	<b>MIC e GF AAS</b>
Arbóreo 2	$426 \pm 32$	$377 \pm 47$
Basmati	< LOQ	< LOQ
Orgânico Branco 6	$136 \pm 8$	$103 \pm 8$
Parboilizado Integral 2	$172 \pm 10$	$212 \pm 11$
Vermelho 1	$220 \pm 8$	$233 \pm 7$
LOD, $\text{ng g}^{-1}$	15,6	15,8
LOQ, $\text{ng g}^{-1}$	28,6	52,7

As concentrações obtidas utilizando os métodos de preparo de amostra e as técnicas de detecção independentes não apresentaram diferença estatística significativa, com nível de confiança de 95% (teste  $t$ ). Esse resultado indica a exatidão do procedimento de extração do As com a mistura  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e  $\text{HNO}_3$ .

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS, três materiais de referência certificados (CRM) de farinha de arroz: “*National Institute of Standards and Technology*” (NIST) 1568b, “*European Reference Materials*” (ERM) BC211 e “*National Metrology Institute of Japan*” (NMIJ) 7532-a, foram submetidos ao procedimento de extração com  $\text{HNO}_3$   $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, foi feita a quantificação das espécies de As por HG-CT-AAS. Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 15.** Análise dos materiais de referência certificados submetidos à extração com HNO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup> e determinação das espécies de As por HG-CT-AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

	NIST 1568b		ERM BC211		NMIJ 7532-a	
	Certificado,	Encontrado,	Certificado,	Encontrado,	Certificado,	Encontrado,
	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>
<b>iAs</b>	92 ± 10	89,0 ± 0,4	124 ± 11	121 ± 3	298 ± 8	267 ± 27
<b>MMA</b>	11,6 ± 3,5	10,8 ± 1,2	-	< LOQ	-	< LOQ
<b>DMA</b>	180 ± 12	172 ± 1	119 ± 13	123 ± 1	18,6 ± 0,8	18,2 ± 1,7
<b>Σespécies de As</b>		272 ± 1		244 ± 3		285 ± 27

Como pode ser observado na Tabela 15, recuperações quantitativas das espécies iAs, MMA e DMA nos três materiais de referência certificados avaliados foram obtidas (89,6-103%). Essas recuperações estão dentro do intervalo aceitável pela FDA para CRMs, que são de 80 a 120%.<sup>120</sup> Ainda, quando comparados os valores encontrados e os valores certificados, não foi observada diferença estatística significativa a um nível de confiança de 95% (teste *t*).

Realizando o balanço de massa, o somatório das concentrações obtidas para as espécies de As nos materiais de referência certificados NIST 1568b, ERM CB211 e NMIJ 7532-a estão de acordo com os valores certificados para As total (NIST 1568b: 285 ± 14 ng g<sup>-1</sup>; ERM CB211: 260 ± 13 ng g<sup>-1</sup>; e NMIJ 7532-a: 320 ± 10 ng g<sup>-1</sup>), não sendo observada diferença significativa entre os valores encontrados e os valores certificados a um nível de confiança de 95% (teste *t*).

Adicionalmente, a cromatografia a líquido acoplada à ICP-MS foi utilizada para avaliar a exatidão do método de especiação de As por HG-CT-AAS. A LC-ICP-MS foi escolhida, uma vez que essa técnica é amplamente empregada para a análise de especiação química de As no arroz. Para o propósito, cinco amostras de arroz foram submetidas ao mesmo procedimento de extração e as espécies de As foram posteriormente quantificadas por LC-ICP-MS. A análise de especiação química de As por LC-ICP-MS foi gentilmente realizada pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) e os resultados fornecidos são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Comparação entre as concentrações das espécies iAs, MMA e DMA, em  $\text{ng g}^{-1}$ , encontradas no arroz por HG-CT-AAS e por LC-ICP-MS.

Amostra de arroz	HG-CT-AAS			LC-ICP-MS		
	iAs	MMA	DMA	iAs	MMA	DMA
Arbóreo 4	$39,2 \pm 4,5$	$< 8,75$	$1414 \pm 65$	$59,9 \pm 5,8$	$< 1,65$	$1402 \pm 5$
Branco 3	$39,4 \pm 5,4$	$< 8,75$	$32,2 \pm 1,5$	$35,4 \pm 1,6$	$< 1,65$	$32,6 \pm 2,3$
Integral 11	$137 \pm 7$	$< 8,75$	$403 \pm 2$	$137 \pm 2$	$< 1,65$	$393 \pm 2$
Jasmine 1	$89,5 \pm 5,5$	$< 8,75$	$215 \pm 10$	$92,9 \pm 1,8$	$< 1,65$	$209 \pm 3$
Orgânico Integral 2	$127 \pm 4$	$< 8,75$	$91,1 \pm 1,7$	$121 \pm 3,3$	$< 1,65$	$93,0 \pm 1$

O teste estatístico  $t$  foi aplicado para comparação dos resultados obtidos por HG-CT-AAS e por LC-ICP-MS para análise de especiação química de As. A análise dos dados mostrou que os valores não apresentaram diferença significativa entre si. Desta forma, as duas técnicas de quantificação das espécies de As fornecem resultados equivalentes, que não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%. Por fim, fica evidente que o método desenvolvido HG-CT-AAS é uma alternativa viável, e permite a análise de especiação química de As em arroz com exatidão, mesmo em baixa concentração e com desempenho equivalente às técnicas cromatográficas acopladas a ICP-MS.

### 5.7 Estimativa da ingestão diária (EDI) da espécie iAs para avaliação do risco de exposição ao consumo do arroz

A avaliação do risco à saúde humana decorrente da ingestão de alimentos contaminados requer estimativa sobre a quantidade de alimento consumido e informações quantitativas acerca da concentração do elemento químico e/ou suas espécies. O método mais confiável para essa avaliação é a medida direta das concentrações dos contaminantes. Dado que o arroz representa uma fonte de exposição significativa ao As, principalmente na sua forma mais tóxica, iAs, a estimativa de ingestão diária se torna um parâmetro necessário para avaliação do risco à saúde humana.

Para o cálculo da estimativa da ingestão diária, *Estimation of Dietary Intake* (EDI), de iAs, levou-se em consideração o procedimento proposto pela *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR).<sup>135</sup> A metodologia se baseia no cálculo definido como a concentração do contaminante, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , multiplicado pelo consumo do respectivo alimento (C), em kg por dia, e dividido pelo peso corporal, em kg.

$$\text{EDI} = \frac{\text{Concentração } (\mu\text{g/kg}) \times \text{Consumo do alimento (kg/dia)}}{\text{Peso corpóreo (kg)}}$$

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo diário de arroz no Brasil é cerca de 160,3 g por habitante.<sup>136</sup> Considerando um indivíduo com massa corporal de 70 kg e as concentrações de iAs determinadas em cada amostra avaliada, são apresentados os valores de EDI na Tabela 17.

Conforme é possível observar, a EDI de iAs através do consumo de arroz Branco, Parboilizado Branco, Orgânico Branco, Integral, Parboilizado Integral, Orgânico Integral e arroz Gastronômico foi de 0,143; 0,196; 0,250; 0,216; 0,209; 0,270 e 0,155  $\mu\text{g As kg}^{-1}/\text{dia}$ , respectivamente.

O Comitê de Especialistas para Aditivos e Contaminantes Alimentares da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive* (JECFA), estabeleceu em 2010, um valor limite de confiança inferior (BMDL) para 0,5% de aumento na incidência de câncer ocasionado por iAs, usando uma série de estudos para estimar a exposição a partir de água potável e alimentos, com diferentes concentrações de iAs.<sup>137</sup> O BMDL<sub>0.5</sub> foi calculado em 3,0  $\mu\text{g}$  de As por kg de peso corporal por dia.<sup>137</sup>

Quando comparados os valores de EDI obtidos com o valor de BMDL<sub>0.5</sub> estabelecido pelo JECFA, todos os valores ficaram abaixo de 3,0  $\mu\text{g As kg}^{-1}/\text{dia}$ , indicando uma baixa exposição e risco ao iAs devido ao consumo do arroz avaliado no presente estudo.

**Tabela 17.** Estimativa da ingestão diária (EDI) para a espécie iAs através do consumo das amostras de arroz analisadas.

<b>Tipo de Arroz</b>	<b>iAs</b>	<b>EDI</b>
<b>Arroz Branco</b>	<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{g As kg}^{-1}</math> /dia)</b>
Branco 1	51,2 $\pm$ 1,0	0,117
Branco 2	108 $\pm$ 1	0,248
Branco 3	39,4 $\pm$ 5,4	0,090
Branco 4	< 7,83	-
Branco 5	48,1 $\pm$ 1,4	0,110
Branco 6	89,6 $\pm$ 3,4	0,205
Branco 7	56,1 $\pm$ 2,1	0,128
Branco 8	69,4 $\pm$ 6,8	0,159
Branco 9	47,6 $\pm$ 1,2	0,109
Branco 10	56,2 $\pm$ 1,3	0,129
Parboilizado Branco 1	77,0 $\pm$ 1,0	0,176
Parboilizado Branco 2	70,2 $\pm$ 3,1	0,161
Parboilizado Branco 3	89,2 $\pm$ 1,0	0,204
Parboilizado Branco 4	106 $\pm$ 4	0,242
Orgânico Branco 1	162 $\pm$ 8	0,370
Orgânico Branco 2	155 $\pm$ 12	0,354
Orgânico Branco 3	77,3 $\pm$ 2,1	0,177
Orgânico Branco 4	61,4 $\pm$ 2,9	0,141
Orgânico Branco 5	63,3 $\pm$ 1,5	0,145
Orgânico Branco 6	136 $\pm$ 1	0,311
<b>Arroz Integral</b>		
Integral 1	68,7 $\pm$ 2,7	0,157
Integral 2	99,8 $\pm$ 6,0	0,228
Integral 3	88,1 $\pm$ 0,4	0,202
Integral 4	107 $\pm$ 10	0,245
Integral 5	100 $\pm$ 1	0,230
Integral 6	24,6 $\pm$ 1,9	0,056



Integral 7	113 ± 9	0,260
Integral 8	105 ± 7	0,240
Integral 9	68,3 ± 5,2	0,157
Integral 10	106 ± 9	0,242
Integral 11	138 ± 7	0,315
Integral 12	115 ± 5	0,264
<hr/>		
Parboilizado Integral 1	97,7 ± 5,6	0,224
Parboilizado Integral 2	112 ± 3	0,257
Parboilizado Integral 3	71,9 ± 7,4	0,165
Parboilizado Integral 4	83,2 ± 3,4	0,191
<hr/>		
Orgânico Integral 1	81,7 ± 1,9	0,188
Orgânico Integral 2	127 ± 4	0,291
Orgânico Integral 3	144 ± 1	0,331
<hr/>		
<b>Arroz Gastronômico</b>		
<hr/>		
Arbóreo 1	102 ± 5	0,234
Arbóreo 2	84,0 ± 2,9	0,192
Arbóreo 3	71,3 ± 0,1	0,163
Arbóreo 4	39,2 ± 4,5	0,090
<hr/>		
Basmati	26,9 ± 5,7	0,061
<hr/>		
Jasmine 1	89,5 ± 5,5	0,205
Jasmine 2	14,1 ± 2,1	0,032
<hr/>		
Preto 1	111 ± 7	0,255
Preto 2	34,8 ± 2,6	0,080
Preto 3	51,6 ± 1,4	0,118
<hr/>		
Vermelho 1	143 ± 8	0,328
Vermelho 2	39,3 ± 1,5	0,091
<hr/>		
Selvagem	66,1 ± 2,8	0,151
<hr/>		
Sushi	76,4 ± 1,8	0,175
<hr/>		
<b>Arroz de outros países</b>		
<hr/>		
Branco / EUA	94,3 ± 3,5	0,216
<hr/>		
Integral / EUA	91,0 ± 6,3	0,208
<hr/>		

Jasmine / Tailândia	70,3 ± 3,9	0,161
Arbóreo / Itália	113 ± 8	0,259
Carnaroli / Itália	111 ± 6	0,255
Branco / Japão	33,1 ± 2,1	0,076
Branco / Uruguai	65,6 ± 0,3	0,150

Recentemente, a exposição diária ao iAs pelo consumo de arroz e seus produtos derivados tem sido relatada em muitos países. Em trabalho realizado por Sand e colaboradores<sup>138</sup>, os autores indicaram um consumo diário de 0,07  $\mu\text{g As kg}^{-1}$  de iAs por adultos suecos através de consumo de arroz. O baixo valor de EDI foi atribuído pelos autores ao hábito alimentar com baixo consumo de arroz. Por outro lado, a maior exposição alimentar ao iAs ocorreu na dieta asiática, onde o consumo de arroz é superior ao dos países europeus. Chen e colaboradores<sup>139</sup> relataram que a ingestão de iAs através do consumo de arroz na Tailândia foi na faixa de 0,079-0,104  $\mu\text{g As kg}^{-1}$ /dia. Em trabalho realizado por Wong e colaboradores<sup>140</sup>, o valor de EDI para iAs relacionado ao consumo de arroz pela população de Hong Kong foi de 0,180  $\mu\text{g As kg}^{-1}$ /dia. Os valores de EDI obtidos no presente trabalho se assemelham aos valores obtidos em estudos feitos com arroz produzido e consumido em países asiáticos. Essa semelhança se deve ao alto consumo do arroz no Brasil, equivalente ao consumo do alimento nos países asiáticos.

Vale ressaltar que o estudo de avaliação de risco da ingestão de iAs através do EDI é uma estimativa, na qual não é considerada a redução do contaminante devido ao processos de cozimento ou demais tratamentos culinários que possam alterar a fração bioacessível de As. Ainda, embora sejam dadas estimativas para a ingestão diária de iAs, esses valores não correspondem ao conteúdo de iAs, isto é, a fração bioacessível.

## 6. Conclusões

O método proposto empregando o sistema HG-CT-AAS apresentou desempenho analítico satisfatório para a análise de especiação química de As em arroz, atendendo os limites das legislações vigentes. Após ajuste dos parâmetros operacionais relativos ao sistema HG-CT-AAS semiautomatizado, foi possível separar eficientemente as espécies iAs, MMA, DMA e TMAOs. Ainda, foi observado que o método possui boa precisão entre as medidas, com desvio padrão relativo próximo a 7%. A precisão não foi significativamente afetada mesmo considerando a operação manual do sistema e, conseqüentemente, pequenos deslocamentos no tempo de retenção das espécies químicas estudadas.

No presente estudo não foi possível obter a mesma sensibilidade entre as espécies de As avaliadas. Com isso, quando utilizado o sistema HG-CT-AAS foi necessário a construção de curvas de calibração para cada uma das espécies de As: iAs, MMA, DMA e TMAOs.

O emprego da solução de  $\text{HNO}_3$  0,28 mol  $\text{L}^{-1}$  possibilitou a extração quantitativa das espécies iAs, MMA, DMA e TMAOs nas amostras de arroz garantindo a total integridade nas condições utilizadas. Os ensaios de adição e recuperação do analito apresentaram recuperações quantitativas, variando de 94 a 102% para as quatro espécies de As determinadas. A exatidão, avaliada através da análise de materiais de referência certificados de arroz, apresentou recuperações quantitativas das espécies iAs, MMA e DMA (90-103%). Os limites de quantificação obtidos, de 7,83; 8,75; 5,41 e 4,75  $\text{ng g}^{-1}$  para iAs, MMA, DMA e TMAOs, respectivamente, foram satisfatórios, atendendo os limites das legislações vigentes.

Com relação à determinação de As total nas amostras de arroz, as concentrações de As total apresentaram uma média de 179  $\text{ng g}^{-1}$  (<28,6 a 1511  $\text{ng g}^{-1}$ ; n=53). Quando comparados os resultados obtidos com o limite máximo tolerável para As no arroz estabelecido pela ANVISA (300  $\text{ng g}^{-1}$ ), seis amostras apresentaram valores superiores, com concentrações de As total de  $671 \pm 33$ ;  $491 \pm 35$ ;  $426 \pm 32$ ;  $1511 \pm 48$ ;  $365 \pm 30$  e  $359 \pm 23$   $\text{ng g}^{-1}$ . Ainda, quando comparadas as amostras cultivadas de forma tradicional com as de forma orgânica, não foram observadas diferenças nos dois tipos de plantio, indicando que a presença do As no arroz não está relacionada somente ao uso de praguicidas e fertilizantes químicos, mas também com as características do solo e da água utilizada para cultivo da planta.

As espécies iAs e DMA foram as formas de As detectadas nas amostras de arroz após análise de especiação química por HG-CT-AAS. A espécie MMA apresentou concentração

inferior ao limite de quantificação ( $<8,75 \text{ ng g}^{-1}$ ) em todas as amostras analisadas. O iAs representou de 47 a 69% da concentração total de As presente no arroz. Nenhuma das amostras apresentaram teores de iAs acima dos limites máximos estabelecidos pela UE ( $200 \text{ a } 250 \text{ ng g}^{-1}$ ) e CODEX ALIMENTARIUS ( $200 \text{ a } 350 \text{ ng g}^{-1}$ ). Contudo, vale ressaltar que duas amostras de arroz apresentaram resultados acima do limite máximo de iAs estabelecido pela ANVISA ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ) para arroz destinado a alimentos infantis.

Com relação ao DMA, a espécie orgânica representou de 31 a 53% da concentração de As total presente no arroz. Vale destacar que todas as amostras que apresentaram teores de As total acima do permitido pela legislação brasileira ( $300 \text{ ng g}^{-1}$ ) foram as que apresentaram maiores concentrações de DMA. Com isso, pode-se concluir que a concentração de As total não é o único parâmetro para a avaliação do risco de contaminação com relação ao consumo de arroz, uma vez que as diferentes espécies químicas de As possuem toxicidade muito distintas ao organismo humano.

Considerando os valores de EDI para iAs obtidos no presente trabalho, todos os valores ficaram abaixo de  $3,0 \mu\text{g As kg}^{-1}/\text{dia}$ , indicando uma baixa exposição e risco ao iAs devido ao consumo do arroz analisado.

Vale ressaltar que os resultados obtidos por HG-CT-AAS e por LC-ICP-MS para análise de especiação química de As em arroz não apresentaram diferença significativa. Desta forma, HG-CT-AAS mostrou-se uma alternativa viável e com desempenho equivalente às técnicas cromatográficas acopladas a ICP-MS.

Pode-se afirmar que os objetivos propostos no presente estudo foram atingidos. Foi desenvolvido um método com menor custo de montagem e análise, o qual permite a análise de especiação química de As em arroz em baixos níveis de concentração e com limites de quantificação que atendem os limites das legislações internacionais vigentes. No Brasil ainda não há um método analítico oficial que permita a análise de especiação química do As no arroz. Atualmente os Laboratórios de Defesa Agropecuária (LFDAs) têm como meta o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos para a quantificação das frações orgânica e inorgânica de As em alimentos. Dessa forma, o método desenvolvido torna-se uma proposta para a determinação de espécies de As em arroz para fins de avaliação de risco e fixação de limites máximos de iAs no cereal.

## Sugestões para futuros trabalhos

Com o método desenvolvido HG-CT-AAS tem-se como perspectiva a sua aplicação para análise de especiação química de As na fração bioacessível do arroz. Com isso, é possível obter-se uma avaliação mais realista do risco à saúde humana pela ingestão do arroz.

O emprego da HG-CT-AAS para a determinação das espécies trivalentes de As pode ser feito. No presente trabalho levou-se em consideração somente o conteúdo de iAs (As(III) + As(V)), MMA(III + V) e DMA(III + V), uma vez que segundo as legislações vigentes, somente o conteúdo total de iAs é monitorado. Contudo, por se tratar de um método com geração seletiva das espécies trivalentes de As (com o uso de solução tampão de pH 6), com o emprego da solução L-cisteína 2% (m v<sup>-1</sup>) para a prévia redução das espécies pentavalentes de As, o conteúdo das espécies As(V), MMA(V) e DMA(V) pode ser estimado por diferença.

Vale destacar que o método HG-CT-AAS desenvolvido pode também ser aplicado para a análise de especiação química de As em outros tipos de alimentos. A diferença estaria na constituição da matriz, na qual o método de preparo da amostra poderia ser adaptado para outro tipo de alimento e, as espécies de As posteriormente determinadas por HG-CT-AAS.

## 7. Referências

1. Jain, C. K.; Ali, I. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques *Water Res.* **2000**, *34*, 4304.
2. Huang, J.-H.; Ilgen, G.; Fecher, P. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 800.
3. Sommella, A.; Deacon, C.; Norton, G.; Pigna, M.; Violante, A.; Meharg, A. A. Total arsenic, inorganic arsenic, and other elements concentrations in Italian rice grain varies with origin and type *Environ. Pollut.* **2013**, *181*, 38.
4. Batista, B. L.; Souza, J. M. O.; De Souza, S. S.; Barbosa Jr, F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption *J. Hazard. Mater.* **2011**, *191*, 342.
5. Sun, G.-X.; Williams, P. N.; Zhu, Y.-G.; Deacon, C.; Carey, A.-M.; Raab, A.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments *Environ. Int.* **2009**, *35*, 473.
6. Schoof, R. A.; Yost, L. J.; Eickhoff, J.; Crecelius, E. A.; Cragin, D. W.; Meacher, D. M.; Menzel, D. B. A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 839.
7. Meharg, A. A.; Rahman, M. M. Arsenic Contamination of Bangladesh Paddy Field Soils: Implications for Rice Contribution to Arsenic Consumption *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 229.
8. Donard, O. F. X.; Caruso, J. A. Trace metal and metalloid species determination: evolution and trends *Spectrochim. Acta B* **1998**, *53*, 157.
9. Reid, M. S.; Hoy, K. S.; Schofield, J. R. M.; Uppal, J. S.; Lin, Y.; Lu, X.; Peng, H.; Le, X. C. Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations *Trends Anal. Chem.* **2020**, *123*, 115770.

10. Maher, W.; Foster, S.; Krikowa, F.; Donner, E.; Lombi, E. Measurement of Inorganic Arsenic Species in Rice after Nitric Acid Extraction by HPLC-ICPMS: Verification Using XANES *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 5821.
11. Narukawa, T.; Suzuki, T.; Inagaki, K.; Hioki, A. Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC-ICP-MS *Talanta* **2014**, 130, 213.
12. Raber, G.; Stock, N.; Hanel, P.; Murko, M.; Navratilova, J.; Francesconi, K. A. An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish *Food Chem.* **2012**, 134, 524.
13. Huang, J.-H.; Ilgen, G.; Fecher, P. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 800.
14. Huang, J. H.; Fecher, P.; Ilgen, G.; Hu, K. N.; Yang, J. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey *Food Chem.* **2012**, 130, 453.
15. Kato, L. S.; De Nadai Fernandes, E. A.; Raab, A.; Bacchi, M. A.; Feldmann, J. Arsenic and cadmium contents in Brazilian rice from different origins can vary more than two orders of magnitude *Food Chem.* **2019**, 286, 644.
16. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100C **2004** <<https://publications.iarc.fr/120>> Acessado em 07 de janeiro de 2020.
17. WHO. World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds. **2001** <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42366>> Acessado em 07 de janeiro de 2020.
18. Carbonell-Barrachina, Á. A.; Signes-Pastor, A. J.; Vázquez-Araújo, L.; Burló, F.; Sengupta, B. Presence of arsenic in agricultural products from arsenic-endemic areas and strategies to reduce arsenic intake in rural villages. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53, 531.
19. Cortinas, I.; Field, J. A.; Kopplin, M.; Garbarino, J. R.; Gandolfi, A. J.; Sierra-Alvarez, R. Anaerobic Biotransformation of Roxarsone and Related N-Substituted Phenylarsonic Acids *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 2951.

20. Stolz, J. F.; Perera, E.; Kilonzo, B.; Kail, B.; Crable, B.; Fisher, E.; Ranganathan, M.; Wormer, L.; Basu, P. Biotransformation of 3-Nitro-4-hydroxybenzene Arsonic Acid (Roxarsone) and Release of Inorganic Arsenic by Clostridium Species. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 818.
21. Soignet, S. L.; Frankel, S. R.; Douer, D.; Tallman, M. S.; Kantarjian, H.; Calleja, E.; Stone, R. M.; Kalaycio, M.; Scheinberg, D. A.; Steinherz, P.; Sievers, E. L.; Coutré, S.; Dahlberg, S.; Ellison, R.; Jr, R. P. W. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia *J. Clin. Oncol.* **2001**, 19, 3852.
22. IARC, International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/ClassificationsAlphaOrder.pdf> Acessado em 07 de janeiro de 2020.
23. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. In Agency for Toxic Substances and Disease Registry **2007** <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3> Acessado em 07 de janeiro de 2020.
24. Barra, C. M.; Santelli, R. E.; Abrão, J. J.; Guardia, M. d. I. Especificação de arsênio - uma revisão *Quím. Nova* **2000**, 23, 58.
25. Fowler, B. A.; Selene, C. H.; Chou, J.; Jones, R. L.; Chen, C. J. Chapter 19 - Arsenic In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*; Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L. T., Eds.; Academic Press: Burlington, **2007**, p 367.
26. Council, N. R. *Arsenic in Drinking Water*, **1999** The National Academies Press: Washington, DC.
27. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. Arsenic round the world: a review *Talanta* **2002**, 58, 201.
28. Gong, Z.; Lu, X.; Cullen, W. R.; Chris Le, X. Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, 16, 1409.
29. Brown, R. M.; Newton, D.; Pickford, C. J.; Sherlock, J. C. Human Metabolism of Arsenobetaine Ingested with Fish *Hum. Exp. Toxicol.* **1990**, 9, 41.



30. Hsueh, Y.-M.; Hsu, M.-K.; Chiou, H.-Y.; Yang, M.-H.; Huang, C.-C.; Chen, C.-J. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake *Toxicology Letters* **2002**, *133*, 83.
31. Larsen, E. H.; Francesconi, K. A. Arsenic concentrations correlate with salinity for fish taken from the North Sea and Baltic waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **2003**, *83*, 283.
32. Francesconi, K. A. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry*, **2010**, *82*, 373.
33. Gao, Y.; Baisch, P.; Mirlean, N.; Rodrigues da Silva Júnior, F. M.; Van Larebeke, N.; Baeyens, W.; Leermakers, M. Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Açú Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption. *Chemosphere*, 2018, *191*, 89.
34. Cenzano, M. R. D.; Marco, A. R.; Cervera, M. L.; La Guardia, M. D. Cereals and pulses In *Handbook of Mineral Elements in Food (First Edition)*, **2015**, p 521.
35. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rice international commodity profile **2006** <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Rice/Documents/Rice\\_Profile\\_Dec-06.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Documents/Rice_Profile_Dec-06.pdf)> Acessado em 07 de janeiro de 2020.
36. CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. A Cultura do Arroz **2015** <<http://www.conab.gov.br>> Acessado em 10 de janeiro de 2020.
37. Walter, M.; Marchezan, E.; Avila, L. A. d. Arroz: composição e características nutricionais *Ciência Rural* **2008**, *38*, 1184.
38. Mei, X. Q.; Wong, M. H.; Yang, Y.; Dong, H. Y.; Qiu, R. L.; Ye, Z. H. The effects of radial oxygen loss on arsenic tolerance and uptake in rice and on its rhizosphere *Environ. Pollut.* **2012**, *165*, 109.
39. Fan, J.-X.; Wang, Y.-J.; Liu, C.; Wang, L.-H.; Yang, K.; Zhou, D.-M.; Li, W.; Sparks, D. L. Effect of iron oxide reductive dissolution on the transformation and immobilization of arsenic in soils: New insights from X-ray photoelectron and X-ray absorption spectroscopy *J. Hazard. Mater.* **2014**, *279*, 212.

40. Meharg, A. A.; Zhao, F. J. Springer: Berlin, 2012. The Physiology of Arsenic in Rice. In *Arsenic & Rice (First Edition)* **2012**.
41. Zavala, Y. J.; Gerads, R.; Gürleyük, H.; Duxbury, J. M. Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human Health *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 3861.
42. Kim, J.-Y.; Kim, W.-I.; Kunhikrishnan, A.; Kang, D.-W.; Kim, D.-H.; Lee, Y.-J.; Kim, Y.-J.; Kim, C.-T. Determination of arsenic species in rice grains using HPLC-ICP-MS *Food Sci. and Biotechnol.* **2013**, *22*, 1509.
43. Xu, X. Y.; McGrath, S. P.; Meharg, A. A.; Zhao, F. J. Growing Rice Aerobically Markedly Decreases Arsenic Accumulation *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 5574.
44. Talukder, A. S. M. H. M.; Meisner, C. A.; Sarkar, M. A. R.; Islam, M. S.; Sayre, K. D.; Duxbury, J. M.; Lauren, J. G. Effect of water management, arsenic and phosphorus levels on rice in a high-arsenic soil–water system: II. Arsenic uptake *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *80*, 145.
45. Duan, G.; Liu, W.; Chen, X.; Hu, Y.; Zhu, Y. Association of arsenic with nutrient elements in rice plants *Metallomics* **2013**, *5*, 784.
46. Abedin, M. J.; Cresser, M. S.; Meharg, A. A.; Feldmann, J.; Cotter-Howells, J. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 962.
47. Kumarathilaka, P.; Seneweera, S.; Meharg, A.; Bundschuh, J. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) is influenced by environment and genetic factors *Sci. Total Environ.* **2018**, *642*, 485.
48. Rahman, M. A.; Hasegawa, H.; Rahman, M. M.; Rahman, M. A.; Miah, M. A. M. Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain *Chemosphere* **2007**, *69*, 942.
49. Rahman, M. A.; Hasegawa, H. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 4645.
50. Carey, A.-M.; Lombi, E.; Donner, E.; de Jonge, M.; Punshon, T.; Jackson, B.; Guerinot, M.; Price, A.; Meharg, A. A review of recent developments in the speciation

- and location of arsenic and selenium in rice grain *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3275.
51. Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E.; Feldmann, J. Speciation without Chromatography Using Selective Hydride Generation: Inorganic Arsenic in Rice and Samples of Marine Origin *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 993.
  52. Petursdottir, A. H.; Friedrich, N.; Musil, S.; Raab, A.; Gunnlaugsdottir, H.; Krupp, E. M.; Feldmann, J. Hydride generation ICP-MS as a simple method for determination of inorganic arsenic in rice for routine biomonitoring *Anal. Methods* **2014**, *6*, 5392.
  53. Sun, G.-X.; Williams, P. N.; Carey, A.-M.; Zhu, Y.-G.; Deacon, C.; Raab, A.; Feldmann, J.; Islam, R. M.; Meharg, A. A. Inorganic Arsenic in Rice Bran and Its Products Are an Order of Magnitude Higher than in Bulk Grain *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 7542.
  54. Jackson, B. P.; Punshon, T. Recent Advances in the Measurement of Arsenic, Cadmium, and Mercury in Rice and Other Foods *Curr. Environ. Health Rep.* **2015**, *2*, 15.
  55. FDA, Food and Drug Administration. Analytical results from inorganic arsenic in rice and rice products sampling. **2013** <<http://www.fda.gov/downloads/>> Acessado em 08 de maio de 2018.
  56. Segura, F. R.; de Oliveira Souza, J. M.; De Paula, E. S.; da Cunha Martins, A.; Paulelli, A. C. C.; Barbosa, F.; Batista, B. L. Arsenic speciation in Brazilian rice grains organically and traditionally cultivated: Is there any difference in arsenic content? *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 169.
  57. Williams, P. N.; Zhang, H.; Davison, W.; Meharg, A. A.; Hossain, M.; Norton, G. J.; Brammer, H.; Islam, M. R. Organic matter-solid phase interactions are critical for predicting arsenic release and plant uptake in Bangladesh paddy soils. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 6080.
  58. Quazi, S.; Datta, R.; Sarkar, D. Effects of soil types and forms of arsenical pesticide on rice growth and development. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2011**, *8*, 445.
  59. MAPA, Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e. Abastecimento. Instrução Normativa MAPA N° 17 DE 18/06/2014. **2014**.

- < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-17-de-18-de-junho-de-2014.pdf/view>> Acessado em 20 de março de 2019.
60. FDA, Food and Drug Administration. Statement on Proposed Action Level for Inorganic Arsenic in Infant Rice Cereal. <<https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/metals/ucm367263.htm>> Acessado em 15 de março de 2019.
61. Signes-Pastor, A. J.; Carey, M.; Meharg, A. A. Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children *Food Chem.* **2016**, *191*, 128.
62. Menon, M.; Sarkar, B.; Hufton, J.; Reynolds, C.; Reina, S. V.; Young, S. Do arsenic levels in rice pose a health risk to the UK population? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *197*, 110601.
63. Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; López-Sánchez, J. F.; Centrich, F.; Rubio, R. A fully validated method for the determination of arsenic species in rice and infant cereal products *Pure Appl.Chem.* **2012**, *84*, 225.
64. Punshon, T.; Jackson, B. P. Essential micronutrient and toxic trace element concentrations in gluten containing and gluten-free foods *Food Chem.* **2018**, *252*, 258.
65. EU, European Commission. EU Amends Maximum Levels Of Inorganic Arsenic In Foodstuffs. <<https://www.sgs.com/en/news/2015/07/safeguards-12015-eu-amends-maximum-levels-of-inorganic-arsenic-in-foodstuffs>> Acessado em 08 de maio de 2018.
66. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n° 42, de 29 de agosto de 2013 sobre Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042\\_29\\_08\\_2013.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html)> Acessado em 10 de janeiro de 2019.
67. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n° 193, de 12 de dezembro de 2017 sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) dos contaminantes arsênio inorgânico, cádmio total, chumbo total e estanho inorgânico em alimentos infantis. < <https://www.in.gov.br/materia/>

/asset\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/994292/doi-10.1002/chem.201701013 > Acessado em 10 de janeiro de 2019.

68. Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Leeuwen, H.P.V., Lobinski, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000) *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1453.
69. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K. Introduction. In *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology (First Edition)* **2003**, p.1.
70. Łobiński, R. Speciation—targets, analytical solutions and markets *Spectrochim. Acta B* **1998**, 53, 177.
71. Vilanó, M.; Rubio, R. Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography–atomic fluorescence detection. *Appl. Organomet. Chem.* **2001**, 15, 658.
72. Pizarro, I.; Gómez, M.; Palacios, M. A.; Cámara, C. Evaluation of stability of arsenic species in rice. *Anal Bioanal Chem* **2003**, 376, 102.
73. Pizarro, I.; Gómez, M.; Cámara, C.; Palacios, M. A. Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 495, 85.
74. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *Analyst* **2004**, 129, 373.
75. Narukawa, T.; Inagaki, K.; Kuroiwa, T.; Chiba, K. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC–ICP-MS *Talanta* **2008**, 77, 427.
76. Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe *Anal. Chim. Acta* **2005**, 535, 227.
77. Guzmán Mar, J. L.; Hinojosa Reyes, L.; Mizanur Rahman, G. M.; Kingston, H. M. S. Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3005.

78. FDA, Food and Drug Administration. Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination. <<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479987.pdf>> Acessado em 20 de maio de 2018.
79. Cheng, K.; Choi, K.; Kim, J.; Sung, I. H.; Chung, D. S. Sensitive arsenic analysis by carrier-mediated counter-transport single drop microextraction coupled with capillary electrophoresis. *Microchemical Journal* **2013**, 106, 220.
80. Liu, L.; He, B.; Yun, Z.; Sun, J.; Jiang, G. Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1304, 227.
81. Qu, H.; Mudalige, T. K.; Linder, S. W. Arsenic Speciation in Rice by Capillary Electrophoresis/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Enzyme-Assisted Water-Phase Microwave Digestion. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 3153.
82. Lee, H. G.; Kwon, J. Y.; Chung, D. S. Sensitive arsenic speciation by capillary electrophoresis using UV absorbance detection with on-line sample preconcentration techniques. *Talanta* **2018**, 181, 366.
83. Dedina, J.; Tsalev, D. L. *Hydride generation atomic absorption spectrometry*, **1995**; Vol. 130.
84. Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. D. A geração química de vapor em espectrometria atômica *Quím.Nova* **2002**, 25, 1132.
85. Laborda, F.; Bolea, E.; Baranguan, M. T.; Castillo, J. R. Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over? *Spectrochim. Acta B* **2002**, 57, 797.
86. Qiu, D. R.; Vandecasteele, C.; Vermeiren, K.; Dams, R. Continuous hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for tin: optimization of working parameters and an approach to clarifying the mechanism of stannane generation *Spectrochim. Acta B* **1990**, 45, 439.
87. D'ulivo, A.; Baiocchi, C.; Pitzalis, E.; Onor, M.; Zamboni, R. Chemical vapor generation for atomic spectrometry. A contribution to the comprehension of reaction

- mechanisms in the generation of volatile hydrides using borane complexes *Spectrochim. Acta B* **2004**, *59*, 471.
88. D'ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E. The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate (III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents *Spectrochim. Acta B* **2005**, *60*, 423.
89. D'ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E. Mechanism of Generation of Volatile Hydrides of Trace Elements by Aqueous Tetrahydroborate(III). Mass Spectrometric Studies on Reaction Products and Intermediates *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3008.
90. D'Ulivo, A. Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects. *Spectrochim. Acta B* **2010**, *65*, 360.
91. D'Ulivo, A.; Onor, M.; Pitzalis, E. Role of Hydroboron Intermediates in the Mechanism of Chemical Vapor Generation in Strongly Acidic Media *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6342.
92. Pergantis, S. A.; Winnik, W.; Heithmar, E. M.; Cullen, W. R. Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry *Talanta* **1997**, *44*, 1941.
93. Chu, R. C.; Barron, G. P.; Baumgam, P. A. W. Arsenic determination at submicrogram levels by arsine evolution and flameless atomic absorption spectrophotometric technique *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 1476.
94. Dědina, J.; Matoušek, T. Multiple microflame—a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, *15*, 301.
95. Welz, B.; Melcher, M. Investigations on atomisation mechanisms of volatile hydride-forming elements in a heated quartz cell. Part 1. Gas-phase and surface effects; decomposition and atomisation of arsine *Analyst* **1983**, *108*, 213.
96. Dědina, J.; Welz, B. Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry: mechanism for atomization of arsine. Invited lecture *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, *7*, 307.

97. Welz, B. *Atomic Absorption Spectrometry* (Third edition) **1999**.
98. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A. Multiple microflame quartz tube atomizer — further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry *Spectrochim. Acta B* **2002**, *57*, 451.
99. Moraes, É. M. F. ; Nunes, A. M.; Dressler, V.L.; Dědina, J. Multiple microflame quartz tube atomizer: Study and minimization of interferences in quartz tube atomizers in hydride generation atomic absorption spectrometry *Spectrochim. Acta B* **2009**, *64*, 173.
100. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J. Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on l-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer *Spectrochim. Acta B* **2008**, *63*, 396.
101. Chen, B.; Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; Huang, J.-H. Accurate fast screening for total and inorganic arsenic in rice grains using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7554.
102. Shraim, A.; Chiswell, B.; Olszowy, H. Speciation of arsenic by hydride generation–atomic absorption spectrometry (HG–AAS) in hydrochloric acid reaction medium *Talanta* **1999**, *50*, 1109.
103. Oliveira, A.; Gonzalez, M. H.; Queiroz, H. M.; Cadore, S. Fractionation of inorganic arsenic by adjusting hydrogen ion concentration *Food Chem.* **2016**, *213*, 76.
104. Santos, G. M.; Pozebon, D.; Cerveira, C.; Moraes, D. P. Inorganic arsenic speciation in rice products using selective hydride generation and atomic absorption spectrometry (AAS) *Microchem. J.* **2017**, *133*, 265.
105. Cerveira, C.; Pozebon, D.; Moraes, D. P.; Silva de Fraga, J. C. Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4528.
106. Pitzalis, E.; Onor, M.; Mascherpa, M. C.; Pacchi, G.; Mester, Z.; D’Ulivo, A. Chemical Generation of Arsane and Methylarsanes with Amine Boranes.



- Potentialities for Nonchromatographic Speciation of Arsenic *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1599.
107. Welna, M.; Pohl, P. Potential of the hydride generation technique coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry for non-chromatographic As speciation *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**, *32*, 1766.
108. Del Razo, L. M.; Styblo, M.; Cullen, W. R.; Thomas, D. J. Determination of Trivalent Methylated Arsenicals in Biological Matrices *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *174*, 282.
109. Hernández-Zavala, A.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Paul, D. S.; Walton, F.; Adair, B. M.; Dědina, J.; Thomas, D. J.; Stýblo, M. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer) *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 342.
110. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; González-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J. Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 1456.
111. Moraes, D. P.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Flores, E. M. M.; Dědina, J. Selective generation of substituted arsines-cryotrapping-atomic absorption spectrometry for arsenic speciation analysis in N-methylglucamine antimonate *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1734.
112. Devesa, V.; Maria Del Razo, L.; Adair, B.; Drobná, Z.; Waters, S. B.; Hughes, M. F.; Stýblo, M.; Thomas, D. J. Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1460.
113. Svoboda, M.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Dědina, J. A Miniaturized Cryogenic Trap Design for Collection of Arsanes *Spectrochim. Acta B* **2015**, *111*, 46.
114. Muller, A. L. H.; Muller, C. C.; Lyra, F.; Mello, P. A.; Mesko, M. F.; Muller, E. I.; Flores, E. M. M. Determination of Toxic Elements in Nuts by Inductively Coupled

- Plasma Mass Spectrometry after Microwave-Induced Combustion *Food Anal. Method.* **2013**, *6*, 258.
115. Maciel, J. V.; Knorr, C. L.; Flores, E. M. M.; Müller, E. I.; Mesko, M. F.; Primel, E. G.; Duarte, F. A. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS *Food Chem.* **2014**, *145*, 927.
116. Souza, J. P.; Cerveira, C.; Miceli, T. M.; Moraes, D. P.; Mesko, M. F.; Pereira, J. S. F. Evaluation of sample preparation methods for cereal digestion for subsequent As, Cd, Hg and Pb determination by AAS-based techniques. *Food Chem.* **2020**, 321, 126715.
117. Currier, J. M.; Saunders, R. J.; Ding, L.; Bodnar, W.; Cable, P.; Matoušek, T.; Creed, J. T.; Stýblo, M. Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 843.
118. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Moraes, D. P.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M. Direct Analysis of Methylated Trivalent Arsenicals in Mouse Liver by Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 478.
119. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M. Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues *Metallomics* **2011**, *3*, 1347.
120. FDA Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion **2015** <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/elemental-analysis-manual-eam-food-and-related-products>>  
Acessado em 15 de abril de 2020.
121. Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, **2010**; Sixth Edition.

122. Poletti, J.; Pozebon, D.; Barcellos de Fraga, M. V.; Dressler, V. L.; Moraes, D. P. Toxic and micronutrient elements in organic, brown and polished rice in Brazil *Food Addit. Contam. Part B* **2014**, *7*, 63.
123. CODEX, Codex Alimentarius Committee of Food and Agriculture of the United Nations, FAO The Report of the 10th Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods **2016** <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en>> Acessado em 10 de abril de 2020.
124. Williams, P. N.; Islam, M. R.; Adomako, E. E.; Raab, A.; Hossain, S. A.; Zhu, Y. G.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. Increase in Rice Grain Arsenic for Regions of Bangladesh Irrigating Paddies with Elevated Arsenic in Groundwaters *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 4903.
125. Meharg, A. A.; Lombi, E.; Williams, P. N.; Scheckel, K. G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhu, Y.; Islam, R. Speciation and Localization of Arsenic in White and Brown Rice Grains *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1051.
126. Raab, A.; Williams, P. N.; Meharg, A.; Feldmann, J. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants *Environ. Chem.* **2007**, *4*, 197.
127. Williams, P. N.; Price, A. H.; Raab, A.; Hossain, S. A.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. Variation in Arsenic Speciation and Concentration in Paddy Rice Related to Dietary Exposure *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5531.
128. Meharg, A. A.; Williams, P. N.; Adomako, E.; Lawgali, Y. Y.; Deacon, C.; Villada, A.; Cambell, R. C. J.; Sun, G.; Zhu, Y.-G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhao, F.-J.; Islam, R.; Hossain, S.; Yanai, J. Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 1612.
129. Rahman, M. A.; Rahman, M. M.; Reichman, S. M.; Lim, R. P.; Naidu, R. Arsenic Speciation in Australian-Grown and Imported Rice on Sale in Australia: Implications for Human Health Risk *J. Agric. Food Chemistry* **2014**, *62*, 6016.
130. Tinggi, U.; Schoendorfer, N.; Scheelings, P.; Yang, X.; Jurd, S.; Robinson, A.; Smith, K.; Piispanen, J. Arsenic in rice and diets of children *Food Addit. Contam. Part B* **2015**, *8*, 149.

131. Maher, W.; Duncan, E.; Martin, H.; Snell, P.; Krikowa, F.; Jagtap, R.; Foster, S.; Ezaz, T.; Ellwood, M. J. Arsenic concentrations and speciation in Australian and imported rice and commercial rice products *Environ. Chem.* **2018**, *15*, 387.
132. Carracelas, G.; Hornbuckle, J.; Verger, M.; Huertas, R.; Riccetto, S.; Campos, F.; Roel, A. Irrigation management and variety effects on rice grain arsenic levels in Uruguay *J. Agr. Food Res.* **2019**, *1*, 100008.
133. Moraes Flores, É. M.; Silva, L. C. L. C.; Barin, J. S.; Saidelles, A. P. F.; Zanella, R.; Dressler, V. L.; Paniz, J. N. G. Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta B* **2001**, *56*, 1883.
134. Brown, R. M.; Fry, R. C.; Moyers, J. L.; Northway, S. J.; Denton, M. B.; Wilson, G. S. Interference by volatile nitrogen oxides and transition-metal catalysis in the preconcentration of arsenic and selenium as hydrides. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1560.
135. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Appendix G: Calculating Exposure Doses **2005** <<https://www.atsdr.cdc.gov/hac/phamanual/appg.html>> Acessado em 15 de abril de 2020.
136. IBGE, Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro: IBGE, **2011** <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>> Acessado em 15 de abril de 2020.
137. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-second meeting. Summary and Conclusions Issued 16th. March 2010. **2010** <<http://www.fao.org/3/a-at868e.pdf>> Acessado em 18 de abril de 2020.
138. Sand, S.; Concha, G; Öhrvik, V; Abramsson, L. Inorganic Arsenic in Rice and Rice Products on the Swedish Market **2015** <<https://stage-livsmedelsverket.se.slv.se/globalassets/publikationsdatabas/rapporter/2015/inorganic-arsenic-in-rice-and-rice-products-on-the-swedish-market-2015---part-2>> Acessado em 18 de abril de 2020.

139. Chen, H.-L.; Lee, C.-C.; Huang, W.-J.; Huang, H.-T.; Wu, Y.-C.; Hsu, Y.-C.; Kao, Y.-T. Arsenic speciation in rice and risk assessment of inorganic arsenic in Taiwan population *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 4481.
140. Wong, W. W. K.; Chung, S. W. C.; Chan, B. T. P.; Ho, Y. Y.; Xiao, Y. Dietary exposure to inorganic arsenic of the Hong Kong population: Results of the first Hong Kong Total Diet Study. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 379.