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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE PESCADO POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA, DE MASSAS E TÉCNICAS ACOPLADAS

ARIANE VANESSA ZMOZINSKI

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

ARIANE VANESSA ZMOZINSKI

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE PESCADO POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA, DE MASSAS E TÉCNICAS ACOPLADAS

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

Profa Dra. Márcia Messias da Silva Orientadora A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2010 e julho de 2014, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Márcia Messias da Silva. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Bernhard Welz

Profa. Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnicki

DunissyNaa Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento

Dr. João Henrique Zimnoch dos

Profa. Dra. Márcia Messias da Silva

Orientadora

Aviane Vanessa Zmozinski

Doutoranda

"Não desampares a sabedoria, e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá.

O princípio da sabedoria é: Adquire a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquire o entendimento."

A minha amada avó Jacira Maria Nercolino (in memoriam)

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado com sua destra de justiça e amor incondicional.

A meus pais Ariovaldo e Liamara Zmozinski por serem exemplos de vida e amor, pelas palavras de incentivo e ensinamento.

Ao meu esposo e amor da minha vida Rafael Silveira Peres, que fez dos meus sonhos os seus e esteve comigo em todos os momentos.

À Professora Márcia Messias da Silva pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação, amizade e confiança neste desafio.

À Professora Maria Goreti Rodrigues Vale pelo carinho, amizade e apoio.

À Professora Isabel Cristina Ferreira Damin, companheira durante a realização desse trabalho, amiga e por seus valiosos ensinamentos.

Ao professor Alexandre de Jesus pelas palavras de incentivo e preciosos conselhos.

Ao Professor José Fermín Lopez-Sanchez da Universitat de Barcelona (UB) por ter me recebido carinhosamente como parte de sua família científica.

Aos queridos amigos do Laboratório de Análise de Traços: Aline, Álvaro, Wiliam, Luciane, Charles e Leonardo pelos bons momentos, pelas palavras sempre cheias de otimismo e agradável convivência no laboratório.

Aos queridos amigos do Laboratório QÜESTRAM da UB: Sérgio, Virginia, Toni, Albert, Gema, Carmen, Edith, pelo carinho, pelas experiências compartilhadas e onde encontrei uma família que me acolheu tão bem durante o estágio sanduíche.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA POR ESTE TRABALHO TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

- 1. Zmozinski, A.V.; da Silva, M.M.; Damin, I.C.F.; Vale, M.G.R.; Llorente-Mirandes, T.; López-Sanchez, J.F. Does the Determination of Arsenic in Fish Samples Depend on the Method? XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, 2013, Úbeda, Espanha.
- 2. Zmozinski, A.V.; Damin, I.C.F.; Vale, M.G.R.; da Silva, M.M. Estudo da Viabilidade da Determinação de As em Amostras de Pescado Usando Amostragem Direta por GF AAS. 17° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2013, Belo Horizonte, Brasil.
- **3.** Zmozinski, A.V.; Damin, I.C.F.; da Silva, M.M.; Vale, M.G.R. Determination of Cadmiun and Lead in Fresh Fish Samples by Direct Solid Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **12**th **Rio Symposium on Atomic Spectrometry**, **2012**, **Foz do Iguaçu**, **Brasil**.
- 4. Zmozinski, A.V.; Damin, I.C.F.; Vale, M.G.R.; da Silva, M.M. Determinação de Arsênio em Amostras de Pescado por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite Utilizando Amostragem Direta de Sólidos. 5º Congreso Iberoamericano de Química Analítica 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica, 2012, Montevidéu, Uruguai.
- 5. Zmozinski, A.V.; Vale, M.G.R.; da Silva, M.M.; Scartazzini, R.; Damin, I.C.F. Determinação de Arsênio em Amostras de Pescado por Amostragem Direta de Sólidos em LS-GF AAS e HR-CS-GF AAS. 16° Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão, Brasil.

ARTIGOS COMPLETOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS

- 1. Zmozinski, A.V.; Carneado, S.; Ibáñez-Palomino, C.; Sahuquillo, A.; López-Sánchez, J.F.; da Silva, M.M. Method Development for the Simultaneous Determination of Methylmercury and Inorganic Mercury in Seafood. *Food Control*, 46, 351-359, **2014**.
- **2.** Zmozinski, A.V.; Llorente-Mirandes, T.; López-Sanchez, J.F.; da Silva, M.M. Determination of Arsenic Species in Marine Reference Materials and Brazilian and Spanish Seafood by HPLC-ICP-MS. Artigo aceito para publicação na revista *Food Chemistry*, **2014**.
- **3.** Zmozinski, A.V.; Passos, L.D.; Damin, I.C.F.; Espírito Santo, M.A.; Vale, M.G.R.; da Silva, M.M. Determination of Cadmium and Lead in Fresh Fish Samples by Direct Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Methods*, 5, 6416-6424, **2013.**
- **4.** Zmozinski, A.V.; Damin, I.C.F.; Llorente-Mirandes, T.; López-Sanchez, J.F.; da Silva, M.M. Investigation of Using Direct sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Arsenic in Fish Samples. Sendo redigido.

DEMAIS TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

- **1.** de Jesus, A.; Zmozinski, A.V.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; da Silva, M.M. Determination of Mercury in Naphtha and Petroleum Condensate by Photochemical Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Microchemical Journal*, 110, 227-232, **2013**.
- **2.** de Jesus, A.; Zmozinski, A.V; Damin, I.C.F.; da Silva, M.M.; Vale, M.G.R. Determination of Arsenic and Cadmium in Crude Oil by Direct Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 71, 86-91, **2012**.
- **3.** Damin, I.C.F.; Zmozinski, A.V.; Borges, A.R.; Vale, M.G.R; da Silva, M.M. Determination of Cadmium and Lead in Fresh Meat by Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Methods*, 3, 1379-1385, **2011**.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. IMPORTÂNCIA DO PESCADO E FRUTOS DO MAR	4
2.2. BIOACUMULAÇÃO	5
2.3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS REFERENTES A ARSÊNIO, CÁDMIO, O	СНИМВО
E MERCÚRIO	5
2.3.1. Arsênio	6
2.3.2. Mercúrio	7
2.3.2.1. Ciclo Biogeoquímico	8
2.3.2.2. Metilação e Biomagnificação	9
2.3.2.3. Atualidade	10
2.3.3. Cádmio	12
2.3.4. Chumbo	13
2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO E MERCÚRIO EM AMOSTR	RAS DE
PESCADO E FRUTOS DO MAR	13
2.4.1. Importância da análise de especiação de As	13
2.4.2. Métodos de preparo de amostra para a análise de especiação de As	16
2.4.3. Técnicas de separação das espécies de As	20
2.4.4. Importância da análise de especiação do Hg	22
2.4.5. Métodos de preparo de amostra para a análise de especiação de Hg	22
2.4.6 Técnicas de separação das espécies de Hg	23
2.5. LEGISLAÇÃO	30
2.6. DETERMINAÇÃO TOTAL DE METAIS TRAÇO EM PESCADO E FRUT	OS DO
MAR	32
2.7. ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS POR GF AAS	35
2.8. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRA	AFITE EM
FONTE DE LINHA (LS-GE AAS)	37

2.9. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLU	ÇÃO COM
FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS)	38
3. OBJETIVO GERAL	40
3.1. DETERMINAÇÃO DE As, Cd E Pb EM AMOSTRAS DE PESCADO UTILIZANDO SS-GF AAS:	40
3.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE As E Hg EM AMOSTRAS DE PESCA	ADO E
FRUTOS DO MAR UTILIZANDO HPLC-ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS:	40
4. PARTE EXPERIMENTAL	42
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	42
4.1.1. Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite com Fonte GF AAS)	•
4.1.2. Espectrômetro de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Co	
Forno de Grafite (HR-CS-GF AAS)	43
4.1.3. Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado	(ICP-MS) e
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado ao ICP-MS	45
4.1.4. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado ao Espe	ctrômetro de
Fluorescência Atômica com Geração de Vapor Frio e Radiação UV (HPLC-	
4.1.5. Outros equipamentos	
4.2. LIMPEZA DO MATERIAL	
4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES	48
4.4. MATERIAIS DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS	49
4.5. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AF	RSÊNIO,
MERCÚRIO, CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIO	FILIZADAS
E IN NATURA USANDO SS-GF AAS, SS-HR-CS-GF AAS E ICP-MS	50
4.5.1. Análise direta de sólidos	50
4.5.1.1. Amostras in natura	50
4.5.1.2. Amostras liofilizadas e CRMs	50
4.5.2. Métodos de digestão	50
4.5.2.1. Digestão em forno micro-ondas	

4.5.2.2. Mineralização das amostras de pescado in natura	51
4.5.2.3. Digestão Alcalina com NaOH	52
4.5.2.4. Digestão Alcalina com TMAH	53
4.6. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA DE ARSÊNIO E MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTO	
NATURA E LIOFILIZADAS UTILIZANDO HPLC-ICP-MS E HPLC-UV	-CV-AFS53
4.6.1. Determinação do teor de umidade	53
4.6.2. Análise das espécies de arsênio por HPLC-ICP-MS	53
4.6.3. Análise das espécies de mercúrio por HPLC-UV-CV-AFS	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE	E PESCADO <i>IN</i>
NATURA UTILIZANDO SS-GF AAS.	56
5.1.1. Seleção do comprimento de onda	56
5.1.2. Programa de aquecimento e modificadores	57
5.1.3. Massa de amostra e erros envolvendo a análise direta de sólidos	62
5.1.4. Parâmetros de Mérito	63
5.1.5. Resultados Analíticos	64
5.2. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO	LIOFILIZADAS
UTILIZANDO SS-GF AAS	67
5.2.1. Parâmetros de mérito	71
5.2.3. Curva de Correlação	74
5.3. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO	LIOFILIZADAS
UTILIZANDO SS-HR-CS-GF AAS.	76
5.3.1. Parâmetros de mérito	82
5.3.2. Resultados Analíticos	83
5.4. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO E ARSENOBETAÍNA EM AMOS	STRAS DE
PESCADO LIOFILIZADAS UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS	85
5.4.1. Determinação de As em CRMs e em amostras de pescado liofil	izadas utilizando
ICP-MS	86
5.4.2. Determinação da arsenobetaína em CRMs e em amostras de pes	scado liofilizadas
utilizando HPLC-ICP-MS	87

5.5. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM
AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA
UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS91
5.5.1. Análise da concentração total de As em CRMs utilizando ICP-MS91
5.5.2. Análise das espécies de As em CRMs utilizando HPLC-ICP-MS93
5.5.2.1. Eficiência de extração
5.5.2.2. Recuperação da coluna
5.5.2.3. Testes de Recuperação96
5.5.2.4. Exatidão
5.5.2.5. Parâmetros de Mérito
5.5.3. Comparação dos valores de arsênio inorgânico em CRMs101
5.5. Análise das espécies de As em amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-
ICP-MS104
5.6. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE MERCÚRIO
EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA
UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS
5.6.1. Determinação da concentração total de Hg em CRMs utilizando ICP-MS109
5.6.2. Análise das espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico em CRMs utilizando
HPLC-UV-CV-AFS
5.6.2.1. Parâmetros de Mérito
5.6.2.2. Testes de Recuperação
5.6.3. Determinação de Hg total nas amostras de pescado e frutos do mar utilizando ICP-
MS112
5.6.4. Análise das espécies de metilmercúrio e mercúrio inorgânico nas amostras de
pescado e frutos do mar utilizando HPLC-UV-CV-AFS
6. CONCLUSÕES
6.1. DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE PESCADO <i>IN</i>
NATURA UTILIZANDO SS-GF AAS119

	6.2. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADO	OAS
	UTILIZANDO SS-GF AAS, SS-HR-CS-GF AAS E ICP-MS E ARSENOBETAÍNA	
	UTILIZANDO HPLC-ICP-MS	.119
	6.3. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM	[
	AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA	
	UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS	.120
	6.4. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE MERCÚRIO)
	EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA	A
	UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS	.121
7	. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.122
A	NEXOS	.133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Biogeoquímico do As (adaptado de Wood <i>et al</i> ⁴²)
Figura 2. Ciclo do mercúrio em uma bacia hidrográfica (adaptado de Selin <i>et al.</i> ⁴⁸)9
Figura 3. Estruturas das espécies de As especialmente relevantes em peixes e frutos do mar (adaptado de Francesconi <i>et al.</i> ⁶³)
Figura 4. Porcentagem das espécies de As em peixes, mariscos, algas e arroz destinados a consumo humano (adaptado de Feldmann <i>et al.</i> ¹⁷)
Figura 5. Esquema do sistema acoplado HPLC-ICP-MS (adaptado de Llorente-Mirandes <i>et al.</i> ⁹⁰).
Figura 6. Esquema do sistema acoplado HPLC-UV-CV-AFS (adaptado de Ibáñez-Palomino <i>et al.</i> ¹¹⁷).
Figura 7. Filtros de politereftalato de etileno (Chromafil PET, Macherey – Nagel, tamanho do poro de 0,45 μm) e seringa utilizados no momento da filtragem dos extratos de pescado e frutos do mar para posterior análise em HPLC-ICP-MS
Figura 8. Extratos das amostras de pescado e frutos do mar para posterior análise em HPLC-UV-CV-AFS
Figura 9. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,05% (v/v) de Triton X-100 para (a) Pb e (b) Cd. (□) absorvância integrada normalizada para 1 mg de TORT-2 para o Pb (a) e 0,2 mg de DORM-3 para o Cd (b). (■) 0,5 ng Pb (a) e 50 pg Cd (b) em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ . Ta: 2200 °C e Tp: 900 °C para Pb; Ta:1900 °C e Tp:800 °C para Cd.
Figura 10. Curvas de pirólise para Pb; (\blacksquare) normalizada para 1 mg de TORT-2 com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (\square) 0,5 ng Pb em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (\blacktriangle) 0,5 ng Pb em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ . Ta: 2200 °C.
Figura 11. Curvas de pirólise para Cd; (□) normalizada para 0,2 mg de DORM-3 com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100, (■) 50 pg Cd em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (\blacktriangle) 50 pg Cd em 10 μL de solução aquosa em 0.014 mol L ⁻¹ HNO ₃ Ta: 1900 °C

Figura 12. Perfis de absorvância para Pb e Cd usando SS-GF AAS. As linhas cheias
representam absorção atômica (AA) e as linhas pontilhadas representam o sinal de fundo (BG).
(a) 1 ng Pb; (b) 50 pg Cd; (c) TORT-2; (d) DORM-3 (e) Amostra M2 $in\ natura\ Pb$ (f) Amostra
M2 in natura Cd. Ta = 2200 °C $-$ Tp = 1100 °C para Pb ; Ta = 1700 °C e Tp = 800 °C,
(modificador Pd/Mg/Triton X-100)61
Figura 13. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,06% (v/v) de Triton X-100. (\blacksquare)
absorvância integrada normalizada para 0,1 mg de TORT-2, (\square) 1 ng As em 10 μL de solução
aquosa em 0,014 mol L $^{-1}$ HNO $_3$. Tp: 1000 °C, Ta: 2400 °C68
Figura 14. Curvas de pirólise para As (■) normalizada para 0,1 mg de TORT-2 (□) 1 ng As
em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L^{1} HNO $_3$ Ta: 2400 °C. Nos dois casos foi utilizado
15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico69
Figura 15. Perfis de absorvância para As usando SS-GF AAS. As linhas cheias representam
absorção atômica e linhas pontilhadas sinal de fundo. a) 1ng As b) TORT-2. Ambos em
presença de 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico.
Ta: 2400 °C, Tp: 1200 °C
Figura 16. Influência da massa de TORT-2 na linearidade de resposta utilizando 15 μg Pd + 9
μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C; Ta 2400 °C70
Figura 17. Influência da massa de TORT-2 na linearidade de resposta utilizando 15 μg Pd $^+$
9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C, Ta 2400 °C. 71
Figura 18. Curva de correlação para As utilizando materiais de referência certificados e $15~\mu g$
Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico. Tp 1200 °C,
Ta 2400 °C
Figura 19. Espectro sal NH ₄ H ₂ PO ₄ com 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% Triton X-100.
Tp 1200 °C, Ta 2400 °C
Figura 20. Espectros de absorção da amostra abrótea resolvidos temporalmente na vizinhança
da linha analítica de As 193,696 a) sem a correção; b) com correção por LSBC utilizando
$NH_4H_2PO_4$ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μg Pd + 9 μg Mg +
0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C77
Figura 21. Espectros de absorção do CRM TORT-2 resolvidos temporalmente na vizinhança
da linha analítica de As 193,696 a) sem a correção; b) com correção por LSBC utilizando

NH ₄ H ₂ PO ₄ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.
Figura 22. Espectros de absorção na vizinhança da linha analítica de 193,696 nm para a amostra abrótea utilizando SS-HR-CS-GF AAS a) sem correção b) com correção por LSBC utilizando NH ₄ H ₂ PO ₄ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.
Figura 23. Espectros de absorção na vizinhança da linha analítica de 193,696 nm para o CRM TORT-2 utilizando SS-HR-CS-GF AAS a) sem correção b) com correção por LSBC utilizando NH ₄ H ₂ PO ₄ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.
Figura 24. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,06% (v/v) de Triton X-100. (□) absorvância integrada normalizada para 0,1 mg de amostra abrótea, (•) 1 ng As em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ . Tp: 1200 °C, Ta: 2400 °C80
Figura 25. Curvas de pirólise para As; (□) normalizada para 0,1 mg de abrótea com 15 μg Po + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, (•) 1 ng As em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L ⁻¹ HNO ₃ Ta: 2400 °C.
Figura 26. Influência da massa de amostra abrótea na linearidade de resposta utilizando 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C.
Figura 27. Cromatogramas dos extratos (a) BCR-627 (b) TORT-2 e da (c) amostra M1 por troca catiônica utilizando HPLC-ICP-MS.
Figura 28. Cromatogramas dos extratos da amostra marisco-1 por troca aniônica (a) (linha contínua: amostra não fortificada e linha pontilhada: amostra fortificada com arsênici inorgânico) e (b) troca catiônica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ac espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS)
Figura 29. Cromatogramas dos extratos da amostra pargo por troca aniônica (a) (linha contínua amostra não fortificada e linha pontilhada: amostra fortificada com arsênio inorgânico) e (b) troca catiônica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS)
Figura 30. Cromatograma do extrato DOLT-4 utilizando HPLC-UV-CV-AFS

Figura 31	. Cromate	ogran	nas dos extra	ato	s a) be	rbigão b) can	narão-1 c) abrótea-2 d)	atum-	- 2 (linha
contínua:	amostra	não	fortificada	e	linha	pontilhada:	amostra	fortificada)	com	CH ₃ Hg
utilizando	HPLC-U	JV-C	V-AFS							112

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Concentrações de arsênio inorgânico (iAs) utilizando diferentes métodos e técnicas
de especiação de As encontrados na literatura a partir de 2005 utilizando os CRMs TORT-2,
DOLT-4, BCR 627 e SRM 1566b17
Tabela II. Concentrações de metilmercúrio (CH ₃ Hg ⁺) utilizando diferentes métodos e técnicas
de especiação em amostras de peixes e frutos do mar encontrados na literatura a partir de 2009.
26
Tabela III. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de As, Cd e Pb por SS-GF
AAS
Tabela IV. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de As, Cd e Pb em
amostras de pescado utilizando SS-GF AAS
Tabela V. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de arsênio em
amostras de pescado liofilizadas por SS-HR-CS GF AAS
Tabela VI. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de As e Hg por ICP-MS45
Tabela VII. Características das colunas e as condições cromatográficas para a separação das
espécies de arsênio
Tabela VIII. Programa da mufla utilizado para secagem e calcinação das amostras de pescado
in natura52
Tabela IX. Programa da mufla utilizado para secagem das amostras de pescado. 52
Tabela X. Coeficientes de variação das medidas de cádmio e chumbo em amostras de pescado
liofilizadas e <i>in natura</i> utilizando SS-GF AAS62
Tabela XI. Parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Cd e Pb utilizando
SS-GF AAS64
Tabela XII. Determinação de Cd em materiais de referências certificados usando SS-GFAAS.
64
Tabela XIII. Determinação de Pb em materiais de referências certificados usando SS-GFAAS.
65

Tabela XIV. Resultados analíticos obtidos por SS-GF AAS para Cd em amostras <i>in natura</i> e secas e GF AAS em amostras digeridas. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de Cd en amostra <i>in natura</i> (média ± desvio padrão, n=3)
Tabela XV. Resultados analíticos obtidos por SS-GF AAS para Pb em amostras <i>in natura</i> esecas e GF AAS em amostras digeridas. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de Pb en amostra <i>in natura</i> (média ± desvio padrão, n=3)
Tabela XVI. Parâmetros de mérito para a determinação de As por SS-GF AAS
Tabela XVII. Determinação de As em amostras de pescado liofilizadas utilizando SS-GF AAS e digestão. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média ± desvica padrão, n = 3)
Tabela XVIII. Determinação de As em material de referência certificado TORT-2 por SS-GI AAS, digestões alcalinas por GF AAS e mineralização utilizando HG AAS
Tabela XIX. Parâmetros de mérito para a determinação de As por SS-HR-CS GF AAS83
Tabela XX. Determinação de As em amostras de pescado liofilizadas por SS-HR-CS GF AAS Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3)
Tabela XXI. Determinação de As em amostras de pescado e CRMs utilizando a amostragen direta de sólidos (SS), GF AAS e ICP-MS. Determinação da AB utilizando HPLC-ICP-MS. O resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3)88 Tabela XXII. Determinação de As em amostras de pescado e CRMs utilizando a amostragen direta de sólidos (SS) e GF AAS somadas com as concentrações da AB obtidas pelo HPLC ICP-MS. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média ± desvio padrão n = 3).
Tabela XXIII. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para As total e para As total dos extratos dos CRMs. As concentrações são expressas em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média edesvio padrão, n = 3). Valores de eficiência de extração e recuperação da coluna
Tabela XXIV. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para As total das amostras e para As total dos extratos de pescado e frutos do mar. As concentrações são expressas em μg g ⁻¹ de As em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3). Valores de eficiência de extração e recuperação da coluna.

Tabela XXV. Resultados analíticos obtidos por HPLC-ICP-MS para as espécies de As em
CRMs. Os resultados estão expressos em µg g-1 de As em massa seca (média ± desvio padrão,
n = 3)
Tabela XXVI. Limites de detecção e quantificação das espécies de As utilizando HPLC-ICP-
MS
Tabela XXVII. Resultados analíticos obtidos HPLC-ICP-MS para as espécies de As em
amostras de pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de As em massa
seca (média ± desvio padrão, n = 3)
Tabela XXVIII. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para Hg Total e por HPLC-UV-
HG- AFS para as espécies de Hg em CRMs. As concentrações estão expressas em μg g ⁻¹ de Hg
em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3)
Tabela XXIX. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para Hg total nas amostras de
pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em μg g ⁻¹ de Hg em massa seca (média
\pm desvio padrão, n = 3)
Tabela XXX. Resultados analíticos obtidos por HPLC-UV-CV-AFS para as espécies de
CH ₃ Hg ⁺ e Hg ²⁺ em amostras de pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em
μg g ⁻¹ de Hg em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3)117

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AAS** Espectrometria de absorção atômica (do inglês, *atomic absorption spectrometry*)
- **AB** arsenobetaína
- AC arsenocolina
- **AFS** Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês, atomic fluorescence spectrometry)
- ANOVA Análise de variância
- **APDC** Ácido pirrolidina ditiocarbamato de amônio
- **CE** Eletroforese capilar (do inglês, capillary electrophoresis)
- **CE-ICP-MS** Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry)
- **CP** Pixel central (do inglês, *center pixel*)
- **CRM** Material de referência certificado (do inglês, certified reference material)
- CV Coeficiente de variação
- **CV AAS** Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (do inglês, cold vapor atomic absorption spectrometry)
- **DMA** Ácido dimetilarsínico
- **SS-GF AAS** Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês, *direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*)
- **EAM** Extração assistida por micro-ondas
- EA-A Espécies aniônicas de As não identificadas com tempo de retenção de 148 s
- EA-B Espécies aniônicas de As não identificadas com tempo de retenção de 251 s

- EC-A Espécies catiônicas de As não identificadas com tempo de retenção de 279 s
- **EC-B** Espécies catiônicas de As não identificadas com tempo de retenção de 360 s
- **EFSA** Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (do inglês, *European Food Safety Authority*)
- **EU-RL-HM** Laboratório de Referência para Metais Pesados em Alimentos e Suplementos da União Europeia (do inglês, *European Union Reference Laboratories* for *Heavy Metals*)
- **EVG-AFS** Geração de vapor eletroquímico acoplado a espectrometria de fluorescência atômica (do inglês, *electrochemical vapor generation coulpled to atomic fluorescence spectrometry*).
- **F AAS** Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*)
- **FAO** Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nation*)
- **FP** Potência máxima (do inglês, *full power*)
- **GC-AFS** Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de fluorescência atômica (do inglês, gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry)
- **GC-CV-AFS** Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (do inglês *gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry*)
- **GC-ECD** Cromatografia gasosa com detector de captura eletrônica (do inglês, *gas chromatographic method with electron-capture detector*)
- **GF AAS** Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*)
- **HG AAS** Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês, *hydride* generation atomic absorption spectrometry)

HG-ICP-MS - Geração de hidretos acoplado a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *hydride generation method coupled with the inductively coupled plasma mass spectrometry*)

HPLC-CV-ICP-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência com geração de vapor frio acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, high performance liquid chromatography-cold vapour-inductively coupled plasma mass spectrometry).

HPLC-ES-SRM - Espectrometria de massas com eletrospray e monitoramento de reação selecionada acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *liquid chromatography online with selected reaction monitoring electrospray mass spectrometry*)

HPLC-HG AAS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês, *high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry*)

HPLC-HG AFS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (do inglês, *liquid chromatography coupled to cold vapour atomic fluorescence spectroscopy*)

HPLC-HG-ICP-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a geração de hidretos e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *liquid chromatography coupled to hydride generation and inductively coupled plasma mass spectrometry*).

HPLC-ICP-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*).

HPLC-UV-CV-AFS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio e radiação UV (do inglês, *liquid chromatography coupled to on-line UV irradiation and cold vapour atomic fluorescence spectroscopy*)

HR-CS-GF AAS - Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite com fonte contínua (do inglês, high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry)

HS-SPME-GC-AFS - Microextração em fase sólida com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de fluorescência atômica (do inglês, *head-space solid phase microextraction with gas chromatograph coupled to atomic fluorescence*)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês: *International Agency for Reseach on Cancer*)

iAs - Arsênio inorgânico

IBC - Correção de fundo iterativa (do inglês, *iterative background correction*)

IC-ICP-MS - Cromatografia de íons acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, inductively coupled plasma mass spectrometry)

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, inductively coupled plasma optical emission spectrometry)

ID-GC-ICP-MS - Diluição isotópica com cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, isotope dilution with gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry

IEC/ICP-MS - Cromatografia de troca iônica acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry*)

iHg: mercúrio inorgânico

IMEP - Programa Internacional de Avaliação de Medidas (do inglês, *International Measurement Evaluation Programme*)

LD - Limite de detecção

LLME-CE-UV - Microextração líquido-líquido combinada com eletroforese capilar e detecção ultravioleta (do inglês, *liquid—liquid microextraction combined with capillary electrophoresis-ultraviolet detection*)

LQ - Limite de quantificação

LSBC - Correção de sinal de fundo por algoritmo dos mínimos quadrados (do inglês, *least squares background correction*).

LS-GF AAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite em fonte de linha (do inglês, *line source graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

MA - Ácido monometilarsônico

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeHg - Metilmercúrio

mo - Massa característica

ND - Não determinado

OMS - Organização Mundial de Saúde

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PTFE - Politetrafluoroetileno

R - Fator de correlação

RSD - Desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*)

SON - Sonicação

SPE - Extração em fase sólida

SUS - Sistema de ultrassom

Ta - Temperatura de atomização

TETRA - Íon tetrametilarsônico

TMAO - Óxido de tetrametilarsônico

 $\pmb{TMAP} - Trimetilars \^onico propionato$

TMAH - Tetrametil-hidróxido de amônio

Tp - Temperatura de pirólise

UV - Ultravioleta

v/v - Volume por volume

RESUMO

A determinação de As, Hg, Cd e Pb em amostras de pescado e frutos do mar é de grande interesse analítico devido à potencial toxicidade desses elementos. Neste trabalho foi avaliada a viabilidade da determinação da quantidade total de As, Pb e Cd em amostras de pescado por SS-GF AAS. O método desenvolvido permitiu a análise direta de pescado *in natura* para determinação acurada de Cd e Pb. Porém para As os valores de concentração encontrados não foram concordantes com os valores certificados dos CRMs. Por esta razão, foi realizado um estudo adicional para a determinação do As total utilizando a técnica de ICP-MS. A técnica de HPLC-ICP-MS foi utilizada na verificação da concentração da arsenobetaína (espécie de alta estabilidade térmica). Como a toxicidade do As e Hg é dependente das suas espécies químicas, a quantidade total destes elementos não fornece informação suficiente sobre a toxicidade das amostras analisadas. Desta forma, métodos para análise de especiação das amostras de pecado e frutos do mar do Brasil e da Espanha foram desenvolvidos. A especiação do As foi realizada por HPLC-ICP-MS e a especiação do Hg foi realizada por HPLC-UV-CV-AFS.

ABSTRACT

The determination of As, Hg, Cd and Pb in fish and seafood samples has large analytical interest due to the potential toxicity of these elements. In this work, the feasibility of Cd, Pb and As determination in fresh fish samples using SS-GF AAS was investigated. The results for total Cd and Pb were statistically not different from the certified values at 95% confidence level, but for total As the results were different. For this reason, ICP-MS was also used to determine total arsenic content and HPLC-ICP-MS technique was used to investigate the arsenobetaine (species with high thermal stability) concentration. The toxicity of As and Hg is dependent on its chemical species and the total amount of these metals do not provide enough information about the toxicity of the analysed sample. Thus, an analytical method for determination of arsenic and mercury species in Brazilian and Spanish seafood samples was developed. Arsenic speciation was carried out by HPLC-ICP-MS and mercury speciation by HPLC-UV-CV-AFS.

Zmozinki, A.V. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um tema estratégico que envolve não só o aspecto da saúde pública, mas também a competitividade dos países exportadores no mercado internacional. Neste contexto de práticas comerciais, a importação e exportação tornam-se vulneráveis a diversas barreiras, dada a sua relação com a saúde dos consumidores e em decorrência da necessidade de que os produtos comercializados atendam a padrões cada vez mais rigorosos. Assim, todo e qualquer trabalho científico neste tópico trará direta ou indiretamente grandes contribuições não somente na área econômica, como também no que concerne ao aspecto ambiental.

O pescado é um alimento que apresenta baixa quantidade de gordura saturada, sendo também, fonte de vitaminas e proteínas¹. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o seu consumo seja de 12 kg/ano para cada habitante². Entretanto, devido à contaminação do ambiente aquático pode-se encontrar no pescado e frutos do mar a presença de elementos traço como o arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio. A ocorrência desses elementos é de grande interesse analítico e o monitoramento utilizando métodos analíticos rápidos e confiáveis são extremamente necessários para um controle eficaz e um aumento do volume de amostras analisadas por tempo. Os quais, permitirão a verificação de áreas contaminadas e possíveis ações corretivas.

No Brasil, o controle de resíduos e contaminantes é realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os laboratórios Nacionais Agropecuários (Lanagro) fazem parte do MAPA e são reconhecidos como centros de referência, atuando no desenvolvimento de métodos analíticos, assim como nas pesquisas e monitoramento de programas de contaminantes alimentares³. As, Hg, Cd e Pb estão entre as substâncias controladas pelo MAPA e os níveis máximos estabelecidos estão de acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)⁴. A baixa concentração desses elementos em amostras biológicas requer o uso de técnicas altamente sensíveis. Dentre as técnicas mais utilizadas estão a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), porém essas técnicas, geralmente necessitam de um método de prétratamento de amostra⁵⁻⁷. A fim de evitar estes procedimentos, a técnica de análise direta de

Zmozinki, A.V. INTRODUÇÃO

sólidos (SS) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) vem sendo utilizada. Ela é vantajosa por necessitar de pouco ou nenhum tratamento da amostra e tem se mostrado muito eficiente pela alta sensibilidade que apresenta, possuindo limites de detecção extremamente baixos, devido à ausência de diluição, menor risco de contaminação, elevada velocidade de análise e a eliminação do uso de reagentes⁸.

Por outro lado, a grande maioria das medidas analíticas sempre estiveram relacionadas com a determinação do conteúdo total de um elemento, nos mais diversos tipos de amostras. Entretanto, esse tipo de informação muitas vezes não é suficiente. Investigações bioquímicas e toxicológicas reportam que para organismos vivos, a forma química de um elemento específico, bem como os estados de oxidação desse elemento são de extrema importância⁹. A toxicidade dos compostos de arsênio depende do estado de oxidação, forma química e a solubilidade no sistema biológico. O arsenito (As(III)) é mais tóxico que o arsenato (As(V)), sendo que essas espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas. O As(III) é dez vezes mais tóxico que o As(V) e setenta vezes mais tóxico que o ácido monometilarsônico (MA) e dimetilarsínico (DMA)¹⁰. As espécies orgânicas dominantes na maioria dos frutos do mar é a arsenobetaína (AB), considerada não tóxica¹¹. Problemas cancerígenos, respiratórios, cardiovasculares e nervosos são alguns dos efeitos causados e relatados na literatura pela contaminação por arsênio¹². O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos e poluentes do meio ambiente, sendo que as suas formas orgânicas (principalmente o metilmercúrio) são mais tóxicas do que as formas inorgânicas. O metilmercúrio é um composto que se bioacumula e biomagnifica na cadeia alimentar aquática, chegando ao homem através da ingestão de peixes e derivados contaminados. As espécies orgânicas do mercúrio circulam no sangue por um longo período e gradualmente se acumulam no sistema nervoso central, onde os efeitos tóxicos são mais pronunciados¹³. Estes fatos, demonstram a necessidade do monitoramento das diferentes formas químicas destes elementos em alimentos, como o pescado, que constituem a dieta da população e isto pode ser realizado através das análises de especiação. A análise de especiação é definida como a atividade de identificar e medir individualmente a quantidade de uma ou mais espécies químicas de uma amostra¹⁴, consequentemente há a necessidade de utilizar métodos analíticos que ajudem a diferenciar essas espécies químicas. Para o estudo da especiação de arsênio e mercúrio, normalmente utilizam-se técnicas de separação cromatográficas, todas acopladas com algum tipo de detector. Tais acoplamentos resultam em poderosas técnicas para especiação elementar, permitindo a obtenção de limites de detecção extremamente baixos quando se utiliza detectores adequados como o ICP-MS. A técnica de cromatografia líquida de Zmozinki, A.V. INTRODUÇÃO

alta eficiência acoplada ao ICP-MS (HPLC-ICP-MS) é muito importante na separação e quantificação das espécies em matrizes muito complexas, como as biológicas. Além dessa técnica, o HPLC pode ser acoplado a detectores como o de ICP OES, HG AAS e espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS) para a análise de especiação de As. No caso das espécies de Hg as técnicas mais utilizadas são, além da cromatografia líquida, a cromatografia gasosa (GC), acopladas a detectores como o ICP-MS, CV AAS, AFS e detector de captura eletrônica (ECD)¹⁵.

No ano de 2009 foi publicado pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) um relatório científico¹⁶, destacando a necessidade de controle dos níveis das diferentes espécies de arsênio em vários produtos alimentares, como peixes e frutos do mar. Consequentemente, é notória a urgência de introduzir uma legislação específica na Europa^{16,17}. O tema tratado nesse relatório foi a importância de coletar dados de especiação, principalmente ao que se refere ao arsênio inorgânico em diversos tipos de alimentos, e de vincular esses dados, com informações sobre a exposição alimentar e efeitos causados na saúde humana¹⁶. Nesse relatório, também foi discutido a importância de produzir materiais de referência certificados para arsênio inorgânico, como amostras de pescado e frutos do mar, além do desenvolvimento das análises de especiação para arsênio em uma ampla faixa de alimentos¹⁶.

De acordo com a revisão de Francesconi *et al.*⁹ mais de 400 publicações científicas no período entre 2000 e 2003 mencionam, de uma forma ou outra, a especiação de arsênio. Entre janeiro de 2006 até junho de 2011, foram publicados 101 artigos tratando da especiação do mercúrio em amostras biológicas e ambientais. Este fato mostra o vasto campo de estudo e a importância na determinação das diferentes espécies químicas de arsênio e mercúrio nos mais diversos tipos de amostras, incluindo pescado e frutos do mar. Além disso, no Brasil não há nenhuma diretriz ou norma específica para a quantificação dessas espécies tóxicas nesse tipo de amostra, destacando a importância de mais estudos nessa área de segurança alimentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DO PESCADO E FRUTOS DO MAR

Peixes e frutos do mar são alimentos altamente nutritivos e com baixo teor de gorduras saturadas quando comparado às outras carnes¹. Adotar peixe e frutos do mar na alimentação reflete de forma positiva na saúde, pois os mesmos fortalecem o sistema imunológico, contribuem para a redução dos níveis de colesterol, previnem contra a demência, evitam o diabetes, diminuem as chances de depressão e ajudam na formação dos músculos¹⁸⁻²⁰. Além disso, o pescado é um alimento de fácil digestão e excelente fonte de vitaminas e minerais²¹. Alguns estudos epidemiológicos têm evidenciado que o consumo de pescado e/ou frutos do mar, diminui o risco de doenças coronárias, hipertensão e cancro. Para uma dieta equilibrada, recomenda-se o seu consumo regularmente, de modo a manter o bom funcionamento do organismo e prevenir patologias, sobretudo de foro cardiovascular e oncológico²². Segundo a AHA (American Heart Association) é aconselhado o consumo de duas refeições semanais²³.

Nos últimos anos o Brasil vem implementando políticas para o aumento do consumo de pescados e consequentemente gerando uma maior demanda ao setor produtivo. Campanhas publicitárias do governo federal buscam promover o produto e o setor, além do desenvolvimento da culinária e gastronomia, explorando os benefícios à saúde humana e as características próprias dos pescados²⁴. O consumo per capita aparente de pescado no país em 2011 foi de 9,75 quilos por habitante/ano, com crescimento de 8% em relação ao ano anterior. Desse total, 66% do pescado consumido é originário do Brasil. Este fato fez o país se aproximar do patamar de consumo considerado ideal pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é de 12 quilos por habitante/ano². Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores do mundo até 2030, ano em que a produção pesqueira nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas²⁴.

Em 2011, as exportações de peixes e produtos derivados tiveram como principal destino os Estados Unidos, sendo o maior importador em volume e em valor. A Espanha surge como o segundo comprador, seguido pela França. Entre os produtos mais exportados destacam-se as lagostas e peixes congelados. A categoria "Peixes Congelados" engloba diversas espécies de pescado, tendo como principal destino, assim como as lagostas, os Estados Unidos. Dois outros produtos merecem destaque na exportação de pescado: "ração" de peixe vendida para Hong Kong e "extratos e sucos" enviados à Holanda²⁵.

2.2. BIOACUMULAÇÃO

Os mares e rios são reservatórios de muitas substâncias nocivas despejadas indiscriminadamente pelo homem. Os peixes, por serem consumidores e pertencerem ao nível superior do ecossistema aquático, acumulam metais em seu organismo. Isto ocorre através da ingestão de alimentos ou de material suspenso na água, além da adsorção dos metais em superfícies de tecidos e de membranas²⁶. Estas substâncias podem desempenhar funções benéficas ou maléficas para a saúde humana, sendo dependentes da concentração, uma vez que têm propriedades bioacumulativas²⁷. A bioacumulação em peixes e frutos do mar ocorre quando a taxa de ingestão desses elementos excede a taxa de eliminação, podendo atingir limites de toxicidade que comprometam a sua própria sobrevivência²⁸. A bioacumulação resulta da passagem desses elementos metálicos através da superfície corporal e/ou via respiratória, cadeia alimentar ou a combinação das duas formas²⁹ e é particularmente importante quando se trata de metais tóxicos, uma vez que através da cadeia alimentar dos organismos heterotróficos, esses elementos vão se acumulando nos organismos dos novos hospedeiros podendo afetar gravemente a sua saúde³⁰.

Embora haja risco da presença de metais tóxicos na cadeia alimentar, a toxicidade provocada por um metal na saúde humana poderá ser influenciada por inúmeros fatores, tais como idade, sexo, estilo de vida e estado imunitário³¹. Neste sentido a prevenção da contaminação dos alimentos, como peixes e frutos do mar, inclui parâmetros que não podem ser ignorados, tais como: monitorização constante desses alimentos, determinação das fontes de contaminação, legislação atualizada para estabelecer níveis máximos permissíveis de contaminantes e envolvimento de todos os intervenientes na cadeia de produção³².

2.3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS REFERENTES A ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO E MERCÚRIO

Mercúrio, cádmio, chumbo e arsênio são considerados tóxicos cumulativos que podem ser assimilados, armazenados e concentrados pelos organismos vivos, através da cadeia alimentar, originando na maioria das vezes efeitos fisiológicos graves³³. Os animais são sensíveis à contaminação por metais tóxicos, sendo o ser humano, o mais sensível, bem como a espécie alvo mais importante. No ser humano a ingestão de alimentos, como peixes e frutos do mar contaminados, pode representar a maior fonte de exposição a estes metais e os sinais toxicológicos são dependentes de inúmeros fatores relacionados com o metal e o hospedeiro³⁴.

2.3.1. Arsênio

Arsênio é um metaloide e pertence ao grupo do nitrogênio. Pode formar ligações com diferentes metais e ligações covalentes com carbono, oxigênio e enxofre. A facilidade que este elemento tem de formar ligações com o enxofre e também a sua afinidade com o fósforo, elementos presentes em organismos vivos, contribuem para sua elevada toxicidade. O As apresenta quatro estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5 ³⁵.

As características altamente tóxicas que alguns compostos de As apresentam, inclusive em baixas concentrações, faz com que este elemento seja estudado continuamente. Há um grande interesse na realização de estudos que permitam compreender a química deste elemento, assim, como o impacto que o mesmo possa produzir no meio e suas interações com os seres vivos através de processos físicos, químicos e biológicos^{36,37}.

O As encontrado no meio ambiente provêm de fontes naturais (atividades geológicas e/ou vulcânicas) e antropogênicas (queima de combustíveis fósseis, produção de fertilizantes e detergentes contendo fosfato, uso de pesticidas à base de As)³⁸.

Na atmosfera são encontradas as espécies inorgânicas As(III) e As(V) associadas a material particulado e em concentrações relativamente baixas³⁸. Nos solos, o As encontra-se fundamentalmente associado aos processos de desgaste de rochas ígneas e sedimentares, em concentrações de aproximadamente 6 $\mu g g^{-1}$. A arsenopirita (FeAsS) e trisulfeto de arsênio (As_2S_3) são as formas mais comuns de arsênio em minerais³⁹. Já em águas de superfícies e subterrâneas a concentração natural de As é de aproximadamente 1 a 10 $\mu g L^{-1}$. É importante destacar que em episódios de contaminação por As, estes níveis podem ser superados³⁸. Devido a processos geológicos naturais, em algumas zonas das águas subterrâneas, encontram-se níveis elevados de As^{40} . A espécie majoritária nestes casos é o As(V), embora em condições altamente redutoras, têm-se detectado o $As(III)^{40}$.

O As também pode formar diversos compostos orgânicos, sendo os ácidos MA e DMA as formas mais comuns³⁸. Em organismos marinhos acumulam-se (por mecanismos de bioacumulação) quantidades consideráveis de arsênio orgânico³⁸.

A toxicidade do As é dependente da sua forma química, estado de oxidação, taxa de absorção na célula, taxa de eliminação e natureza química dos substituintes no composto de As⁴¹. As espécies inorgânicas As(III) e As(V) são as mais tóxicas¹⁰. O arsenito é cerca de dez vezes mais tóxico que o arsenato, e os compostos inorgânicos são cem vezes mais tóxicos que as formas metiladas de As (MA e DMA). Na Figura 1 está representado o ciclo biogeoquímico do As.

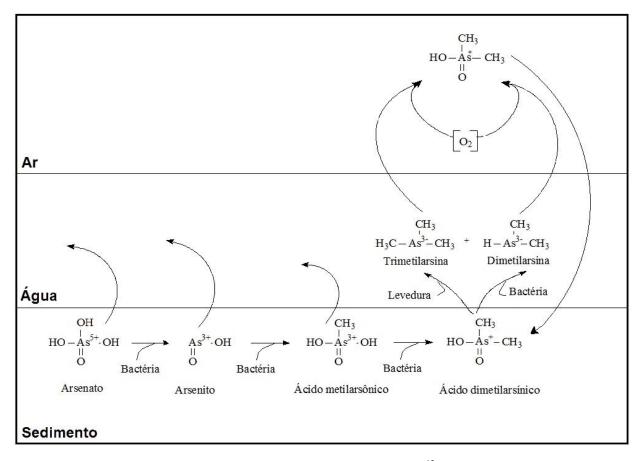


Figura 1. Ciclo Biogeoquímico do As (adaptado de Wood *et al*⁴²).

Os seres humanos podem estar expostos as diferentes espécies químicas do As provenientes da ingestão de alimentos, água ou meio ambiente em geral. A entrada do arsênio no organismo se dá através das vias respiratória e oral, sendo que o acúmulo de arsênio pode ocorrer na pele, cabelo e unhas. Problemas cancerígenos, respiratórios, cardiovasculares e nervosos são alguns dos efeitos causados e relatados na literatura pela contaminação com arsênio¹².

2.3.2. Mercúrio

O mercúrio é um elemento químico de número atômico 80 e peso atômico 200,59 u. Pertence ao grupo 12 da tabela periódica e é conhecido por ser o único metal líquido à temperatura ambiente. O Hg apresenta três estados de oxidação: Hg elementar (metálico, Hg⁰), Hg monovalente (íon mercuroso, Hg₂²⁺) e Hg bivalente (íon mercúrico, Hg⁺²). Esse metal também pode ser encontrado como alquilmercuriais, alcoximercuriais e fenilmercuriais sendo o metilmercúrio (CH₃Hg⁺) a espécie de maior importância toxicológica.⁴³

O mercúrio é uma relevante fonte de contaminação ambiental no Brasil, sobretudo na Amazônia, devido ao seu intenso uso pela atividade garimpeira⁴⁴. O mercúrio também é utilizado na área industrial, odontológica, farmacêutica e na agricultura. A intensificação do seu uso resultou no aumento significativo da contaminação ambiental e em episódios de intoxicação humana a nível mundial¹³.

Para avaliar a qualidade de vida e predizer o impacto potencial sobre os seres humanos se faz necessário o conhecimento da concentração, transporte e dinâmica do mercúrio e metilmercúrio no meio ambiente⁴⁴.

2.3.2.1. Ciclo Biogeoquímico

Os ciclos biogeoquímicos são processos naturais que por diversos meios reciclam vários elementos em diferentes formas químicas do meio ambiente para os organismos e, posteriormente, fazem o processo inverso para o meio ambiente. Os caminhos percorridos ciclicamente entre o meio abiótico e o biótico pela água e os elementos químicos constituem os chamados ciclos biogeoquímicos⁴⁵. Para a avaliação do impacto ambiental que o mercúrio provoca ao meio ambiente e aos seres vivos é de extrema importância o estudo e o conhecimento destes ciclos⁴⁶.

Azevedo *et al.*⁴⁷ relatam que há dois ciclos (global e local) envolvidos no transporte e distribuição do mercúrio no ambiente. O primeiro envolve a evaporação do mercúrio pela desgaseificação da crosta terrestre (incluindo áreas de terra e de água), circulação atmosférica de seus vapores e sua precipitação com as chuvas, retornando ao solo e às águas. O ciclo local é favorecido pelas fontes antropogênicas de emissão e depende da metilação do mercúrio inorgânico. O mercúrio sofre transformações através das reações de oxidação-redução e metilação-desmetilação, sendo transportado no meio ambiente, que os distribuem pelos ecossistemas terrestre, aquático e atmosférico.

O ciclo biogeoquímico do Hg se dá através da volatilização do mercúrio elementar que é emitido para a atmosfera. Quando o Hg⁰ é oxidado a Hg²⁺, o mesmo pode ser rapidamente precipitado nas águas das chuvas ou adsorvido em pequenas partículas, depositando-se nos solos e/ou águas. A oxidação do mercúrio elementar na atmosfera é um importante mecanismo que implica na deposição do mercúrio no solo e na água⁴⁷. A Figura 2 mostra um esquema do ciclo do Hg em uma bacia hidrográfica.

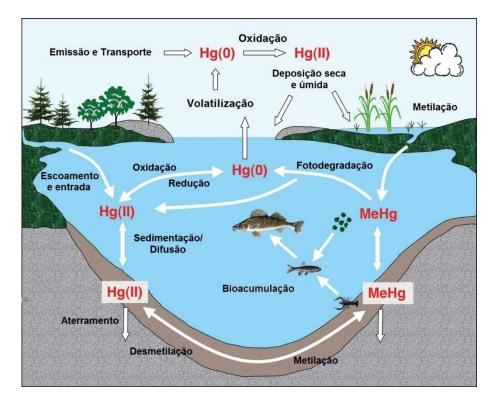


Figura 2. Ciclo do mercúrio em uma bacia hidrográfica (adaptado de Selin *et al.*⁴⁸).

2.3.2.2. Metilação e Biomagnificação

Através da deposição atmosférica, erosão do solo e lixiviação, ocorre a contaminação por mercúrio nos ecossistemas aquáticos, sendo que a distribuição das diversas espécies de mercúrio que entram no sistema aquático é regulado por processos químicos, físicos e biológicos, que ocorrem na interface ar/água e água/sedimento. É válido destacar que o mercúrio confinado nos sedimentos dos rios, lagos e oceanos pode permanecer ativo como substrato para a metilação por vários anos, mesmo quando a fonte poluidora é eliminada⁴⁷.

Nos sistemas aquáticos a metilação do mercúrio constitui a etapa chave do seu ciclo e é de extrema importância em ambientes remotos e contaminados⁴⁶. O metilmercúrio pode ser formado no meio ambiente através de metabolismo microbiano (processos bióticos), bem como por processos químicos que não envolvem organismos vivos (processos abióticos). A metilação é influenciada pela temperatura, concentração de bactérias presentes no meio, pH, condições de oxirredução e variações sazonais⁴⁹. Dentre as espécies de mercúrio, o metilmercúrio é a espécie mais tóxica, possui fácil penetração através das membranas biológicas e eficiente bioacumulação. A lipossolubilidade dessa espécie facilita a sua passagem através dos tecidos aumentando seu potencial tóxico¹³.

Após o processo de biotransformação, ocorre outro processo denominado biomagnificação. Nesse último, o metal tende a se acumular nos seres vivos à medida que se avançam os níveis tróficos. Desta forma a biota aquática, se torna a principal via de transferência do mercúrio de um ambiente contaminado para os seres humanos, especialmente quando o peixe faz parte da dieta alimentar⁴⁴.

Os peixes e crustáceos, por acumularem contaminantes do ambiente aquático, como o mercúrio, por exemplo, têm sido utilizados em larga escala em estudos de segurança alimentar²⁹. Em virtude desses organismos serem capazes de concentrar metais pesados em níveis superiores aos encontrados na água, tornam-se responsáveis por grande parte da dinâmica destes poluentes no ambiente marinho⁵⁰, são como bioindicadores, que permitem a avaliação direta e indireta da sanidade de diversos compartimentos do ambiente aquático⁵¹. Nos peixes, os elementos traço concentram-se em músculos e vísceras abdominais, como fígado, rim e trato gastrointestinal⁵² e suas concentrações aumentam em função do ganho de peso e do aumento da idade dos organismos aquáticos⁵³.

2.3.2.3. Atualidade

No dia 05/12/2012 foi publicado no site G1- Natureza⁵⁴, um artigo sobre os problemas ambientais relacionados com a contaminação dos mares e oceanos pelo mercúrio.

"Uma série de nove estudos elaborados por uma equipe de 70 cientistas especializados em vida marinha indica que peixes, crustáceos e demais animais de oceanos do planeta estão cada vez mais sendo contaminados por mercúrio lançado no ar pelo homem, que acaba depositado nas águas marítimas.

Em cem anos, ao longo do século 20, a poluição na superfície dos mares pelo metal mais do que dobrou, apontam as pesquisas, publicadas em uma edição especial do periódico "Environmental Health Perspectives".

A poluição por mercúrio é resultado de ações como mineração, queima de carvão e outros processos industriais, afirmam os cientistas. Os estudos foram realizados por pesquisadores de várias instituições, reunidos no Centro de Pesquisa Colaborativa sobre Ecossistemas, Vida Marinha e Mercúrio, sob a liderança da Universidade Dartmouth, nos EUA.

As pesquisas sugerem que o mercúrio lançado no ar acaba se depositando na água dos oceanos e em regiões costeiras, contaminando animais marinhos. Cerca de 90% do metal encontrado em mar aberto e 56% do identificado em grandes áreas de golfos têm origem no mercúrio emitido na atmosfera, que tem a ação humana como uma das origens.

"Os oceanos abrigam grandes atuns e peixes-espada, que juntos respondem por mais de 50% do mercúrio com origem marinha consumidos pela população dos EUA", afirma a pesquisadora Elsie Sunderland, da Universidade Harvard, uma das coordenadoras dos estudos.

No Atlântico Norte, a estimativa é que "uma redução de 20% do mercúrio depositado nos oceanos após ser lançado no ar traria um declínio de 16% nos níveis do metal encontrados nos peixes da região", diz o professor Robert Mason, da Universidade de Connecticut, que também integra as pesquisas.

Um terço de todas as emissões de mercúrio na atmosfera estão ligadas à indústria ou outros fatores humanos que poderiam ser controlados, afirmam os cientistas.

Apesar de sabermos que a maioria da contaminação das pessoas por mercúrio se dá pelo consumo de peixes marinhos, esta é a primeira vez que cientistas trabalharam juntos para sintetizar o que se sabe sobre o 'caminho' do metal", ressalta a cientista Celia Chen, da Universidade Dartmouth, referindose ao "mapeamento" feito nos estudos.

A ideia de "mapear" o caminho do mercúrio é buscar suas "fontes para diferentes áreas do oceano, e depois rumo à cadeia alimentar, para chegar na maioria dos frutos do mar que consumimos", afirma Chen.

A contaminação por grandes doses de mercúrio pode causar problemas neurológicos, dores de cabeça, déficit de atenção e outros efeitos, além de ser prejudicial para grávidas e poder afetar bebês em formação no útero.

A exposição ao metal é feita em grande parte pelo consumo de alimentos vindos do mar, afirma a pesquisa. Estudos recentes apontam problemas de saúde em concentrações cada vez menores do metal pesado.

Assim, por ser um elemento de ocorrência natural e apresentar larga aplicação, o Hg é considerado um poluente de alto risco, sendo regulado por vários órgãos ambientais tais como

o MAPA⁴. Considerando o exposto anteriormente, a determinação da qualidade química de organismos aquáticos, particularmente o nível de elementos traço no pescado e produtos derivados é extremamente importante para a saúde humana⁵⁵.

2.3.3. Cádmio

O cádmio é um elemento que pode ser encontrado naturalmente na água, solo e atmosfera. Foi descoberto em 1817 e é utilizado na produção de pneus e plásticos e responde a uma composição entre 20% e 35% dos banhos eletrólíticos, sendo também utilizado na fabricação de baterias e outros procedimentos industriais. Por ser um subproduto da exploração do zinco e do chumbo, tornou-se uma das principais fontes de contaminação do meio ambiente⁵⁶.

O cádmio quando presente no ambiente aquático pode acumular-se no sedimento e, por estar aderido a partículas suspensas, torna-se disponível aos organismos aquáticos⁵³. O cádmio entra na cadeia alimentar dos peixes através do consumo direto da água ou da biota. A acumulação desse metal em peixes ocorre em órgãos como intestino, rim, fígado e brânquias e, no caso dos peixes predadores, nos músculos, parte destinada ao consumo humano⁵⁷. O cádmio possui alta afinidade por moléculas de enxofre e nitrogênio e, quando associados a estas moléculas, terá capacidade de entrar nas células e iniciar seus efeitos sobre as moléculas biológicas essenciais. O cádmio é um metal de elevado potencial tóxico⁵⁸ e sua acumulação pode provocar graves doenças, mesmo em baixas concentrações, como a osteoporose, danos irreversíveis nos rins, anemia, rinite crônica, dentre outras. Foi classificado como cancerígeno para humanos pela Agência Internacional de pesquisa em câncer (IARC, do inglês: International Agency for Reseach on Cancer)⁵⁹.

A contaminação de organismos aquáticos possibilita sua entrada na cadeia alimentar do homem. Assim, o cádmio atinge o corpo humano através da ingestão de alimentos. Uma maneira de efetuar a avaliação de risco ambiental por esse elemento é através da análise de peixes e outros organismos aquáticos, chamados de bioindicadores de contaminação, fornecendo importantes informações na avaliação do risco à saúde humana⁶⁰.

2.3.4. Chumbo

Aproximadamente 96% do chumbo presente na atmosfera é de origem antropogênica. Além disso, o chumbo não é encontrado naturalmente na forma de metal, normalmente está combinado com mais de um elemento químico, formando compostos de chumbo. Entre os principais compostos de chumbo são encontrados o tetraetil e tetrametilchumbo que são facilmente adsorvidos por inalação⁵⁸.

Os principais usos dos compostos de chumbo estão relacionados às indústrias extrativas e petrolíferas, baterias, tintas e corantes, cerâmica, cabos, tubulações e munições⁵⁶.

O chumbo, assim como o cádmio também é um metal de elevado potencial tóxico⁵⁸. De acordo com os organismos de saúde, 90% da ingestão de elementos traço e outros contaminantes ocorrem por meio do consumo de alimentos⁶¹. A ingestão de alimentos e o ar inalado são as principais fontes de chumbo no organismo humano. Uma vez absorvido por organismos, o chumbo é geralmente retido por proteínas e então transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados, ou biotransformados⁶¹. O chumbo age principalmente em três sistemas: sistema hematológico, sistema nervoso central e sistema renal. A exposição ao metal tem sido relacionada como causa de retardo mental, distúrbios no sistema reprodutor humano, aumento da pressão sanguínea, deficiência no fígado e disfunções da memória⁵⁸. No organismo, o chumbo é distribuído entre todos os tecidos e fluidos. O sangue e os órgãos representam um compartimento de troca rápida, uma vez absorvido na corrente sanguínea, parte do chumbo é filtrada e excretada e o restante é armazenado em diversos órgãos e no tecido ósseo⁵⁸.

2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO E MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR

2.4.1. Importância da análise de especiação de As

A palavra *especiação* de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), é a distribuição de diferentes espécies químicas de um determinado elemento em uma amostra⁶². Enquanto o termo *análise de especiação* é definido como a atividade de identificar e medir individualmente a quantidade de uma ou mais espécies químicas de uma amostra¹⁴. Um dos pontos a destacar na análise de especiação, é que a informação que se quer deve ser obtida sem alterar a espécie original do elemento contido na amostra. As

espécies de arsênio são encontradas naturalmente em baixas concentrações no meio ambiente de uma forma geral, consequentemente a análise de especiação torna-se mais problemática para este elemento. As desvantagens nesse caso são: instabilidade das espécies durante a amostragem, o armazenamento e o tratamento da amostra, a incompleta recuperação das espécies, as interferências de matriz na etapa da medição dos analitos e a falta de CRMs adequados⁶³.

A análise de especiação de As nos ecossistemas marinhos tem sido tema de extrema relevância nos últimos 20 anos^{64,65}. Os peixes e frutos do mar contém intrinsicamente mais As total que os alimentos terrestres⁶³. De acordo com Francesconi *et al.*⁶³, mais de 50 espécies de arsênio foram identificadas em frutos do mar. As comumente encontradas são as espécies inorgânicas (As(III) e As(V)) e as espécies orgânicas: AB, MA, DMA, óxido de tetrametilarsônico (TMAO) e arsenocolina (AC). Também alguns arseno-açúcares e arsenolipídeos. A Figura 3 mostra algumas estruturas das espécies de As especialmente relevantes em peixes e frutos do mar.

Figura 3. Estruturas das espécies de As especialmente relevantes em peixes e frutos do mar (adaptado de Francesconi *et al.* ⁶³).

As espécies de As inorgânico estão presentes em baixas concentrações, em comparação a concentração total de As quantificada nesse tipo de alimento¹¹. A espécie orgânica dominante na maioria dos frutos do mar é a AB. Testes toxicológicos indicaram que AB é completamente inofensiva e sua ocorrência em frutos do mar não apresenta problemas à saúde humana^{11,66}. As distintas espécies químicas de um mesmo elemento, como o As, apresentam um comportamento químico diferente e isto se reflete em suas diferentes mobilidades, toxicidades e

biodisponibilidade. Na maioria dos casos, esas espécies químicas de interesse ambiental, toxicológico ou biológico são encontradas em níveis traço⁶⁷. Deste modo, é imprescindível dispor de métodos que permitam extrair, separar e medir cada uma de suas espécies e seu baixo nível de concentração. Portanto, a diferença na toxicidade das espécies de As em peixes e frutos do mar reforça a importância da especiação química, visto que a quantidade total de As não fornece informações suficientes sobre a toxicidade da amostra analisada.

Um exemplo da importância da análise de especiação está vinculado à área de alimentos. A mesma desempenha um importante papel no que diz respeito à exposição ao As. Um dos principais problemas enfrentados pelas agências reguladoras de alimentos é a falta de dados, como pôde ser visto no relatório "Scientific Opinion on Arsenic in Food", publicado em 2009, pela EFSA¹6. Nesse relatório foram coletados aproximadamente 100.000 dados de concentração de As em diferentes tipos de alimentos, dos quais dois terços estavam abaixo dos limites de quantificação das técnicas analíticas utilizadas em análise de rotina. A principal deficiência divulgada nesses dados é que 98% expressava a concentração de As total, não considerando as espécies. Os alimentos que apresentaram maiores concentrações de As foram: peixes e mariscos, suplementos a base de algas e arroz. Na Figura 4 é possível visualizar as diferentes espécies de As nos alimentos citados anteriormente.

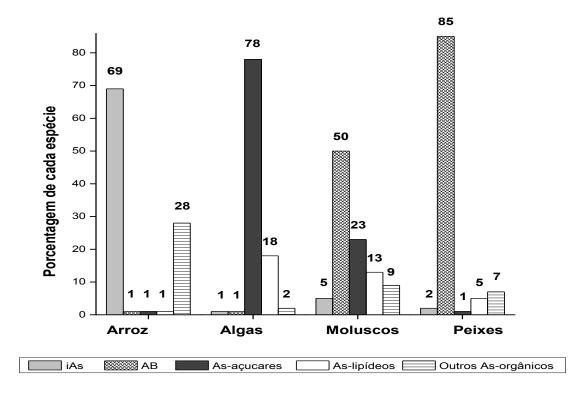


Figura 4. Porcentagem das espécies de As em peixes, mariscos, algas e arroz destinados a consumo humano (adaptado de Feldmann *et al.* ¹⁷).

2.4.2. Métodos de preparo de amostra para a análise de especiação de As

A etapa de extração é crucial para a especiação de qualquer elemento químico. Em relação ao As, a extração deve ser realizada levando em consideração a complexidade da matriz, as espécies de As a serem extraídas e os níveis de contaminação. Nesta etapa, as dificuldades estão relacionadas com a incompleta extração dos compostos de As, a interconversão de espécies e a própria degradação da amostra⁹.

Na maioria dos estudos sobre especiação de As existe a preocupação com a obtenção de máxima eficiência de extração, entretanto, devido à dificuldade que envolve esse processo, muitas vezes, esses valores encontram-se longe de serem quantificados⁶⁷.

Os solventes mais utilizados para a extração das espécies de As em matrizes biológicas é a mistura metanol/água em diferentes proporções. A eficiência de extração é de aproximadamente 90% ⁶⁸⁻⁷⁴, uma vez que espécies orgânicas polares de As tendem a ser extraídas com maior eficiência quando metanol é utilizado. Porém esse solvente não é um extrator adequado para separar as espécies inorgânicas de As^{9,75}. Alguns autores^{70,76,77} descreveram o uso de soluções diluídas de HNO₃ e extrações sequenciais⁶⁹. Dada à polaridade das diferentes espécies de arsênio e a dificuldade experimental das extrações sequenciais, alguns autores questionam a extração quantitativa desses compostos⁷⁸.

Outros procedimentos para a extração de As são relatados na literatura^{10,65,68-72,74,76,77,79-85} e estão descritos na Tabela I. Na extração das espécies de As, além de diferentes solventes, geralmente são empregados alguns sistemas que facilitam o desempenho dessa extração como: sistemas de ultrassom^{10,83}, sonicação^{70,71,81,84}, extração assistida por micro-ondas^{65,68-70,72,74,76,77,79,80,82,86} e agitação mecânica^{10,71,85}.

Após a extração das espécies de As, geralmente é realizada a etapa de "clean up". O clean-up utilizando adsorção em fase sólida é o método mais utilizado na "limpeza" da amostra e separação dos constituintes. Normalmente é utilizada a sílica e/ou alumina, bem como solventes apolares na eluição dos respectivos compostos. Após esta etapa o extrato encontra-se apto para ser injetado em um sistema cromatográfico⁷⁸. Em matrizes biológicas, como a de peixes e frutos do mar, esta etapa contribui para a eliminação de compostos lipídicos⁶⁷.

Tabela I. Concentrações de arsênio inorgânico (iAs) utilizando diferentes métodos e técnicas de especiação de As encontrados na literatura a partir de 2005 utilizando os CRMs TORT-2, DOLT-4, BCR 627 e SRM 1566b.

CRMs	Técnicas Extração		iAs (μg g ⁻¹)	Referências	
		EAM/(HCl/H ₂ O ₂)	0,648		
	HPLC-ICP-MS	EAM /(HNO ₃)	0,663		
		EAM/(NaOH/EtOH)	0,417		
		EAM /(HCl/H ₂ O ₂)	0,614	[76]	
	HPLC-HG-ICP-MS	EAM /(HNO ₃)	ND		
TORT-2		EAM /(NaOH/EtOH)	0,453		
	IEC/ICD MC	EAM /(H ₂ O)	1,133	[60]	
	IEC/ICP-MS	EAM /(MeOH/H ₂ O)	1,233	[68]	
	LIDI G IGD MG	EAM (MeOH/H ₂ O)	0,320	[20]	
	HPLC-ICP-MS	EAM /(HNO ₃)	0,780	[69]	
	HPLC-ICP-MS	EAM /(H ₂ O)	0,100	[79]	
	HPLC-ICP-MS	EAM /(EtOH/NaOH)	0,190	[86]	
	HPLC-ICP-MS	SON/(Acetona/MeOH/ HCl)	0,09	[81]	
	HPLC-ICP-MS		0,340	- [77]	
	HPLC-HG-ICP-MS	EAM /(EtOH/NaOH)	0,470		
	HPLC-HG AFS	-	0,369		
	HPLC-ICP-MS	EAM /(EtOH/NaOH)	0,188	[82]	
	HPLC-HG AFS	SUS/(HCl/KI)	0,320	[83]	
	HPLC-HG AFS	Agitação/(H ₃ PO ₄)	0,450	F4.03	
	HPLC-HG AAS	SUS/(NaOH)	ND	[10]	

		EAM /(HCl/H ₂ O ₂)	0,614	
		EAM /(H ₂ O/MeOH)	0,676	
	_	SON e EAM /(TFA /H ₂ O ₂)	0,315	
		Descrito na referência	0,331	
	HPLC-HG-ICP-MS	EAM /(HNO ₃)	0,823	[70]
		EAM /(HNO ₃ /H ₂ O ₂)	0,714	
		EAM /(H ₂ O)	0,611	
		SON/(H ₂ O)	0,470	
		EAM /(NaOH/ EtOH)	0,453	
		EAM /(HCl/H ₂ O ₂)	0,039	
	HPLC-ICP-MS	$EAM / (HNO_3)$	0,028	
DOLT-4		EAM /(NaOH/EtOH)	0,027	[76]
DOLI-4		EAM /(HCl/H ₂ O ₂)	0,011	[/0]
		$EAM / (HNO_3)$	0,011	
	HPLC-HG-ICP-MS	EAM /(NaOH/EtOH)	0,010	
		EAM /(HCl/H ₂ O ₂)	<0,040	
	HPLC-ICP-MS	$EAM / (MeOH/H_2O)$	ND	
		$SON/(TFA/H_2O_2)$	0,047	[71]
	HPLC-HG AAS	Agitação/(H ₂ O/HCl/HBr)	0,075	

		EAM/(HCl/H ₂ O ₂)	0,011	
		EAM/(H ₂ O/MeOH)	0,012	
		SON e EAM/(TFA /H ₂ O ₂)	0,011	
		Descrito na referência	0,036	
	HPLC-HG-ICP-MS	EAM /(HNO ₃)	0,011	[70]
		EAM /(HNO ₃ /H ₂ O ₂)	0,017	
		EAM /(H ₂ O)	0,011	
		SON/(H ₂ O)	0,010	
		EAM /(NaOH/ EtOH)	0,010	
	IEC/ICP-MS	$EAM/(H_2O)$	0,074	[68]
		EAM /(MeOH/H ₂ O)	0,192	[oo]
	IEC/ICP-MS	EAM /(MeOH)	0,100	[72]
	HPLC-HG AFS	SON/(HNO ₃ /Triton X-100)	0,070	[84]
BCR 627	HPLC-ICP-MS	EAM /(EtOH/ NaOH)	0,015	[86]
	HPLC-ICP-MS	Fase sólida (MeOH/H ₂ O)	0,080	[73]
	IC-ICP-MS	EAM /(enzimas)	ND	[65]
	HPLC-ICP-MS	EAM /(MeOH/H ₂ O)	0,325	[74]

SRM 1566b	HPLC-HG AFS	Agitação/(H ₃ PO ₄)	ND	[10]
	HPLC-HG AAS	SUS/(NaOH)		
	HPLC-ICP-MS	EAM /(EtOH/NaOH)	0,004	[86]
	HPLC-ES-SRM	Agitação/(H ₂ O)	ND	[85]
	HPLC-ICP-MS	EAM /(MeOH/H ₂ O)	1,161	[74]

ND: não determinado; EAM: Extração assistida por micro-ondas; SON: Sonicação;

SUS: Sistema de Ultrassom.

2.4.3. Técnicas de separação das espécies de As

As técnicas acopladas são muito convenientes e favoráveis na determinação dos compostos de As. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ICP-MS é uma das técnicas mais utilizadas na separação e medição das espécies de As em matrizes biológicas, incluindo peixes e frutos do mar^{63,69,71,74,76,77,79-82}. O HPLC associada ao HG AFS^{10,77,83,84}, HG-ICP-MS^{70,76,77} e HG AAS^{10,71} também tem sido relatada na literatura.

A técnica de HPLC-ICP-MS é uma técnica robusta, apresenta baixos limites de detecção, ampla faixa linear e elevada seletividade. Entretanto, a presença de átomos de cloro na amostra, pode provocar uma interferência isobárica com As (elemento monoisotópico de massa 75 (⁷⁵As, [⁴⁰Ar³⁵Cl])). Estas interferências podem ser eliminadas mediante o uso de células de colisão⁸⁷, porém, devido o acoplamento ao HPLC, o íon Cl⁻ migra em um tempo de retenção conhecido e a interferência é controlada monitorando a massa 75 [⁴⁰Ar³⁵Cl]. A comparação dos tempos de retenção é uma das estratégias mais comuns na identificação das espécies de As, juntamente com a adição de padrões a amostra⁸⁸.

A comercialização do ICP-MS impulsionou o desenvolvimento do acoplamento da cromatografia líquida a esta técnica. Este acoplamento converteu-se em uma potente ferramenta na especiação de elementos traço^{67,78}. Para este acoplamento a fase móvel deve ser selecionada levando em consideração a compatibilidade com o detector. A fase móvel, nesse caso, deve

apresentar baixo conteúdo orgânico e baixa concentração de sais⁸⁹. A Figura 5 mostra um esquema do sistema acoplado do HPLC-ICP-MS que foi utilizado neste trabalho. Outra técnica bastante utilizada na especiação de As é a HPLC-HG AFS^{30, 92, 98, 99}. Esta técnica apresenta vantagens como: alta sensibilidade, baixo custo de aquisição e operação quando comparado ao HPLC-ICP-MS.

O gerador de hidretos é acoplado a outros sistemas (HG-ICP-MS^{70,76,77} e HG AAS^{10,71}). As técnicas de HPLC-HG-ICP-MS, HPLC-HG AFS e HPLC-HG AAS estão limitadas a determinação de espécies que formam o hidreto volátil, como as espécies inorgânicas de As e/ou algumas metiladas. Para que as outras espécies atinjam o detector, devem estar na fase gasosa e, por conseguinte, faz-se necessário a derivatização do analito. O desempenho do gerador de hidretos é ligado à forma química do As e, portanto, a sensibilidade da técnica é dependente do analito. No caso da AB (espécie majoritária em pescados e frutos do mar) é necessário o uso de foto-oxidação (decomposição UV)¹⁰.

Finalmente é importante destacar a técnica de espectrometria de massas com eletrospray (ESI-MS) e monitoramento de reação selecionada (HPLC-ES-SRM) acoplada ao HPLC⁸⁵. Esta técnica é capaz de fornecer informações sobre a estrutura do analito, além da capacidade de identificar novos compostos de As. Embora esta técnica permita a ionização total da amostra e detecção do ⁷⁵As, a mesma não apresenta a mesma sensibilidade que o ICP-MS, além de ser mais propensa a efeitos de matriz⁸⁵.

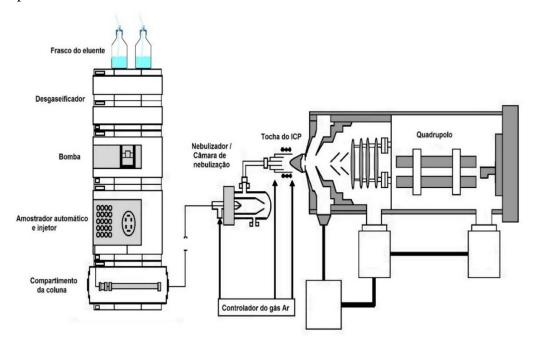


Figura 5. Esquema do sistema acoplado HPLC-ICP-MS (adaptado de Llorente-Mirandes *et al.* ⁹⁰).

2.4.4. Importância da análise de especiação do Hg

A análise de especiação de mercúrio é de extrema relevância em estudos de toxicidade⁴³. O principal objetivo da análise de especiação de mercúrio em amostras biológicas consiste em diferenciar e identificar as espécies orgânicas (especialmente o metilmercúrio), das espécies inorgânicas, uma vez que estas são significativamente menos tóxicas³⁹.

Devido à elevada toxicidade do metilmercúrio em relação às outras espécies, o conhecimento da concentração total de mercúrio em amostras ambientais e biológicas, tornouse insuficiente para fins de avaliação de risco à população. Consequentemente, o interesse no desenvolvimento de técnicas analíticas precisas e exatas para determinação de cada uma das espécies de mercúrio, aumentou consideravelmente nos últimos anos⁹¹. Em amostras biológicas, como as de pescado e frutos do mar, o mercúrio apresenta-se quase que exclusivamente em duas espécies majoritárias, metilmercúrio e íon mercúrico⁹². Como foi dito anteriormente, o metilmercúrio é a espécie mais tóxica presente neste tipo de amostra, desse modo, para a avaliação do potencial risco dos consumidores de pescado e frutos do mar é imprescindível analisar e quantificar essa espécie⁹³.

2.4.5. Métodos de preparo de amostra para a análise de especiação de Hg

Um requisito para obtenção de informações exatas das espécies de mercúrio, está em manter a concentração e a forma química das espécies originais durante o preparo da amostra⁹⁴. É importante salientar que desde a etapa de coleta da amostra até a determinação, é fundamental que não ocorra a degradação de nenhuma das espécies de interesse, bem como a transformação ou interconversão das mesmas⁵⁰. Os principais passos a serem considerados na análise de especiação de Hg em amostras biológicas são⁹⁵:

- a) Especial atenção aos protocolos de limpeza;
- b) Cuidados na conservação e armazenagem, a fim de manter a concentração e a distribuição das espécies;
- c) Extração com o objetivo de garantir a integridade das espécies;
- d) Em alguns casos a pré-concentração;
- e) Separação das espécies de interesse;
- f) Limites de detecção e quantificação da técnica utilizada.

Como foi dito anteriormente, a etapa de extração é crítica na análise de especiação de qualquer elemento químico. Os métodos de extração para análise de especiação de mercúrio

em amostras líquidas são: a extração em fase sólida (SPE), por processos de adsorção ou de troca iônica e também a extração líquido-líquido. Estes métodos são baseados na retenção ou extração seletiva de uma das espécies de mercúrio⁹⁶. Em relação as amostras sólidas, os métodos de extração mais utilizados são a hidrólise ácida ou básica, a destilação e a extração com fluidos supercríticos¹⁵. A hidrólise ácida combinada com a extração por solvente foi proposta pela primeira vez por Westöö⁹⁷. Muitos procedimentos^{92,98-101} que derivam desse estudo seguem os seguintes passos:

- a) Extração das espécies organomercuriais com um íon haleto em pH próximo a zero;
- b) Extração seletiva do metilmercúrio com tolueno;
- c) Nova extração para o meio aquoso utilizando L-cisteína;

O método de extração de hidrólise alcalina normalmente utiliza KOH^{96,102-106} ou tetrametil-hidróxido de amônio (TMAH)^{107,108}, já a extração ácida os mais utilizados são o HCl^{94,109,110} e HNO₃⁹¹. A maioria dos processos de extração para análise de metilmercúrio utilizam o ultrassom^{92,99,100,109-112} ou micro-ondas^{93,94,107,108,113,114}. Na Tabela II estão descritos os procedimentos para a extração de metilmercúrio em diferentes espécies de peixes e frutos do mar encontrados na literatura num período de 2009 a 2014.

Para a determinação do metilmercúrio nas amostras de pescado e frutos do mar, em alguns casos requer o uso de uma etapa adicional, a pré-concentração. A SPE, além de ser considerada um método de separação, também pode ser utilizada na pré-concentração 115. Essa etapa não é obrigatória, ela depende exclusivamente da natureza da amostra e da técnica utilizada.

2.4.6 Técnicas de separação das espécies de Hg

As técnicas de separação cromatográfica são as mais utilizadas na separação de duas ou mais espécies de mercúrio em amostras biológicas¹⁵. A cromatografia gasosa é utilizada para espécies que são voláteis, ou que podem formar compostos voláteis. Na cromatografia gasosa para que haja a conversão das espécies de mercúrio iônico em formas voláteis, são necessários métodos de derivatização "off-line e on-line". Em relação ao tipo de coluna utilizado, há uma forte tendência ao uso de colunas capilares do tipo não polar, que contém uma fase estacionária de fenil ou metilsilicona^{91,93,114}. Este tipo de coluna requer um volume menor de amostra e proporciona melhor separação e resolução do que as colunas empacotadas^{91,93,104,107,114}. Os

detectores mais utilizados na cromatografia gasosa em amostras biológicas são AFS^{91,96,104,107}, ECD^{93,98,101,114} e ICP-MS¹⁰⁸.

A cromatografia líquida, ou cromatografia líquida de alta eficiência é outra técnica bastante utilizada na separação das espécies de mercúrio em amostras ambientais e biológicas. A grande vantagem do HPLC sobre a cromatografia gasosa fundamenta-se na flexibilidade dos mecanismos de separação, considerados superiores para a análise de especiação de Hg^{99,100}, técnica separação de uma ampla variedade de permite compostos organomercuriais 92,99,100,111-113. As técnicas de cromatografia líquida normalmente necessitam de reagentes como: 2-mercaptoetanol, L-cisteína ou ditiocarbamatos para a complexação e posterior separação das espécies de mercúrio. Os detectores mais utilizados na cromatografia líquida na determinação das espécies de mercúrio em amostras biológicas são: o espectrômetro de fluorescência atômica com gerador de vapor frio (CV-AFS)^{103,105,106} e ICP-MS^{78, 86, 87, 98-100}. No entanto, o detector AFS, por ser mais econômico e apresentar a mesma ordem de sensibilidade e seletividade que o ICP-MS, faz do mesmo ideal na determinação das espécies de mercúrio 15,116. A Figura 6 mostra um esquema do sistema de HPLC acoplado ao CV-AFS e radiação UV (HPLC-UV-CV-AFS) que foi utilizado neste trabalho.

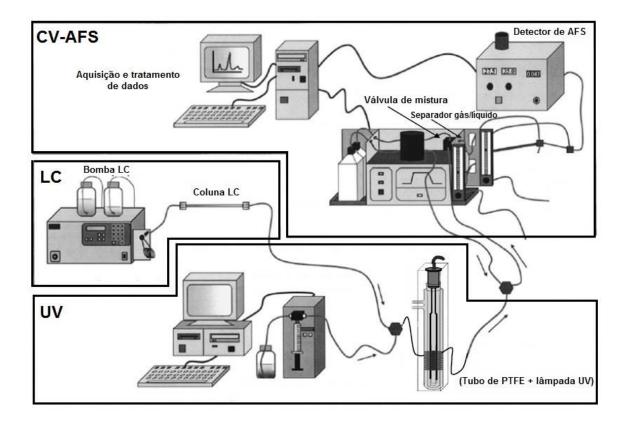


Figura 6. Esquema do sistema acoplado HPLC-UV-CV-AFS (adaptado de Ibáñez-Palomino *et al.* ¹¹⁷).

Outra técnica que possui excelente poder de separação, e é utilizada para análise de especiação de mercúrio, é a eletroforese capilar (CE), especialmente para espécies iônicas e biomoléculas. Apesar das recentes aplicações desta técnica, seu uso em análise de especiação ainda é escasso, uma vez que o detector mais comumente acoplado à CE é o detector por ultravioleta (UV), que apresenta LDs não satisfatórios para análise de especiação de Hg, além do volume de amostra ser limitado¹¹⁰. Somente em trabalhos em que a determinação é feita por ICP-MS ou ESI-MS há uma melhora significativa nos valores de LD⁹⁴.

Tabela II. Concentrações de metilmercúrio (CH₃Hg⁺) utilizando diferentes métodos e técnicas de especiação em amostras de peixes e frutos do mar encontrados na literatura a partir de 2009.

Tipo de amostra	Amostra	Procedimento extração	Extrator	Técnica	CH ₃ Hg ⁺ (μg g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)	Referência
Peixes	Chub	Micro-ondas	HCl + Tolueno	GC-EDC	<0,5	-	[114]
Peixes	Atum Imperador Garoupa Robalo Tilápia Dourado Anchova Peixe Espada	Ultrassom	2-mercaptoetanol + L-cisteína + HCl	HPLC–ICP-MS	0,04- 1,92	83-98	[100]
Peixes	Atum Pirarucu Salmão Corvina Tainha	Micro-ondas	L-cisteína	HPLC-CV-ICP-MS	0,01- 1,00	-	[113]
Peixes	Robalo Spotted gar Largemouth bass Bowfin Bagre	Banho-maria	HNO ₃	GC-CV-AFS	0,5-1,5	-	[91]

Peixes	Chaputa Peixe Espada Corvina Robalo Carpa Dourado Cabeça de Cobra	Ultrassom	HCl + L-cisteína	HPLC-ICP-MS	0,17-0,75	>86%	[112]
Peixes	Chaputa Peixe Espada Corvina Robalo Carpa Dourado Cabeça de cobra	Ultrassom	HCl + 3- mercapto-1- propanosulfonato de sódio	HPLC-ICP-MS	0,0032-0,75	>86%	[111]
Peixes	Anchova	Micro-ondas	HCl	CE-ICP-MS	1,2-3,2	-	[94]
Frutos do mar	Mexilhão Marisco	Ultrassom	HCl	EVG-AFS	0,022-0,034	-	[109]
Peixes	Chub Pike Dourado Peixe Barata Carpa Enguia Perca Sol Truta Salmão	Micro-ondas	HCl + Tolueno	GC-ECD	0,05-0,8	46-100	[93]

Peixes	Salmão Carpa Bagre	Micro-ondas	ТМАН	GC-AFS	0,001-1,16	60-88	[107]
Peixes	Orange-spotted grouper Snubnose pompano Dourado	Hidrólise alcalina	KOH + metanol	GC-CV-AFS	0,007-0,12	37-81	[104]
Peixes	Mercado local	Ultrassom	HCl	LLME-CE-UV	0,004-0,027	-	[110]
Peixes	Bacalhau Salmão Atum	a) Extração Sólido—Líquido b) Micro-ondas c) Extração a temperatura ambiente	ТМАН	ID-GC-ICP-MS	0,002-0,58	84-97	
Frutos do mar	Mexilhão Ostras Vieira Camarão				0,001-0,033	28-98	[108]
Peixes	Bagre Carpa	Banho-maria	КОН	HS-SPME-GC-AFS	0,76	74	[96]
Frutos do mar	Mexilhão Polvo Camarão Lula	Ultrassom	HCl + L- cisteína+ 2- mercaptoetanol	HPLC-ICP-MS	0,003-0,037	-	[92]
Peixes	Atum	_			0,03-0,16		

Peixes	Mercado local	Hidrólise alcalina	KOH + metanol	GC-AED	0,006-0,5	14-100	[102]
Peixes	Sardinha	Célula de micro- difusão	H ₂ SO ₄ + L- cisteína + NaCl + tolueno	GC-ECD	0,002-0,1	40-110	[101]
Peixes	Peixes do Platô de Qinghai Tibet	Hidrólise alcalina	KOH + metanol	HPLC-CV-AFS	0,1-0,6	84-89	[103]
Peixes	Carpa Bagre Tilápia	Hidrólise alcalina	KOH + metanol	HPLC-CV-AFS	0,1-0,4	35-76	[105]
Peixes	Atum Peixe Cavala	Agitação e Centrifugação	H ₂ SO ₄ + KBr + tolueno + L- cisteína	GC-ECD	0,29-0,69	70-82	[98]
Peixes	Carpa	Hidrólise alcalina	KOH + metanol	HPLC-CV-AFS	0,02-0,09	7.4-93	[106]
Peixes	Peixe Cavala Dourado	Ultrassom	HClO ₄ + L-cisteína + tolueno + metanol	HPLC-ICP-MS	0,05-0,3	80	[99]

2.5. LEGISLAÇÃO

Os elementos traço como As, Hg, Cd e Pb estão entre as substâncias tóxicas controladas no Brasil pelo MAPA e os níveis máximos estabelecidos de acordo com o PNCRC, variam entre 0,2-1,0 µg g⁻¹ dependendo do elemento e do tipo de pescado (peixe de cultivo ou de captura)⁴.

Países como Nova Zelândia e Austrália possuem legislação para níveis máximos de arsênio inorgânico (iAs) em pescados e frutos do mar¹¹⁸. O governo desses dois países estabelecem o nível máximo de 2 μg g⁻¹ de iAs para crustáceos e peixes e 1 μg g⁻¹ para moluscos e algas marinhas¹¹⁸. A República da China instituiu um valor de 0,5 μg g⁻¹ de iAs para todo pescado de importação e exportação, com exceção do peixe de cultivo, que o nível máximo permitido é de 0,1 μg g^{-1 119}.

Por outro lado, o governo brasileiro através do MAPA estabeleceu um valor de referência de 1 µg g⁻¹ de As total para pescado⁴, ou seja, o governo brasileiro ainda não tem valores de referência para arsênio inorgânico nesse tipo de amostra.

A União Europeia ainda não instituiu um limite máximo para As total e nem As inorgânico em peixes e frutos do mar em sua legislação 120.

No ano de 2009 foi publicado pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia um relatório científico¹⁶, destacando a necessidade de controle dos níveis das diferentes espécies de arsênio em vários produtos alimentares, como peixes e frutos do mar. Consequentemente, é notória a urgência de introduzir uma legislação específica na Europa^{16,17}. O tema tratado nesse relatório foi a importância de coletar dados de especiação, principalmente ao que se refere ao arsênio inorgânico em diversos tipos de alimentos, e de vincular esses dados, com informações sobre a exposição alimentar e efeitos causados na saúde humana¹⁶. Nesse relatório, também foi discutido a importância de produzir materiais de referência certificados com amostras de pescado e frutos do mar para arsênio inorgânico, além do desenvolvimento métodos de especiação para arsênio em uma ampla faixa de alimentos¹⁶.

Com este propósito, no ano de 2010, o Laboratório de Referência para Metais Pesados em Alimentos e Suplementos da União Europeia (EU-RL-HM) organizou um teste interlaboratorial, desenvolvendo um material de referência de amostra de fígado de cação, com o objetivo de quantificar arsênio inorgânico, metilmercúrio e outros metais traço. A determinação de arsênio inorgânico nesse material desenvolvido pela EU-RL-HM apresentou diversos problemas analíticos. Os laboratórios especializados que participaram desse teste não

foram capazes de chegar a um acordo sobre o valor encontrado para arsênio inorgânico neste material⁷¹. Baer *et al.*⁷¹ concluíram que mais pesquisas nos procedimentos de extração e separação das espécies de As serão indispensáveis para quantificar arsênio inorgânico em amostras de pescado e frutos do mar.

De acordo com Feldmann *et al.*¹⁷ a complexidade da matriz nesse tipo de amostra requer procedimentos precisos, exatos e robustos. No entanto, os procedimentos analíticos utilizados até o presente momento para quantificação de As inorgânico, não cumprem com estes requisitos.

Pétursdóttir *et al.*⁷⁰ e Leufroy *et al.*⁶⁸ publicaram uma revisão onde são mostrados valores de concentração das espécies de As encontradas em CRMs de peixes e frutos do mar, por diversos autores da literatura. Nesta revisão, os autores destacam a grande variabilidade dos valores de As inorgânico nestes CRMs de acordo com o método de extração e detecção empregado. Os autores enfatizam a necessidade de desenvolver métodos confiáveis para a determinação de As inorgânico em peixes e frutos do mar, além da produção de um CRM com valor certificado para As inorgânico.

Na Tabela I são mostrados valores de As inorgânico em CRMs de peixes e frutos do mar utilizando diferentes métodos e técnicas de especiação de As encontrados na literatura num período de 2005 a 2014.

Em relação ao mercúrio, a Norma Geral de Contaminantes e Toxinas em Alimentos (Codex Stan 193-1995) organizado pela FAO e WHO (Organização Mundial da Saúde), estabeleceu níveis máximos de metilmercúrio em peixes de cultivo e captura (0,5 e 1 μg g⁻¹, respectivamente)¹²¹. O Codex recomenda os níveis máximos de substâncias tóxicas permitidas no comércio internacional de alimentos¹²¹.

O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares formados por membros da FAO e WHO propuseram uma dose semanal admissível de 1,6 µg kg⁻¹ em peso corpóreo de metilmercúrio. No entanto, a Comissão Europeia solicitou à EFSA para rever esse valor¹²².

A EFSA publicou em 2012 um parecer científico informando a respeito dos riscos do mercúrio e metilmercúrio a exposição humana¹²². Além disso, de acordo com novos estudos epidemiológicos realizados em crianças, mostrou que os efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados, podem mascarar ou confundir os resultados maléficos da exposição ao metilmercúrio. Consequentemente o valor foi reduzido para 1,3 μg kg⁻¹ em peso corpóreo de metilmercúrio. Embora o Regulamento (CE) N°1881/2006 não prevê limites para a

concentração de metilmercúrio, os valores de 0,5 µg g⁻¹ e 1 µg g⁻¹ são estabelecidos como valores de referência em diferentes tipos de peixes e frutos do mar¹²⁰.

A Instrução Normativa Nº 11 do Brasil (Maio de 2012) regula o nível máximo de Hg total em peixes de cultivo e captura. Os limites estabelecidos são de 1 μg g⁻¹ para peixes de captura e 0,5 μg g⁻¹ para peixes de cultivo^{4,123}. Na Tabela II são mostrados valores de metilmercúrio em diferentes espécies de peixes e frutos do mar encontrados na literatura num período de 2009 a 2014.

2.6. DETERMINAÇÃO TOTAL DE METAIS TRAÇO EM PESCADO E FRUTOS DO MAR

Como foi dito anteriormente, os elementos traço como Hg, As, Cd e Pb estão entre as substâncias tóxicas analisadas pelo MAPA em amostras de pescado. Neste sentido, métodos exatos, rápidos e de baixo custo são de grande importância para aumentar o número de análise de amostras assim como a confiabilidade nos resultados.

O controle de resíduos de metais em amostras de pescado no âmbito do PNCRC, também tem como objetivo obter informações sobre os níveis médios regionais, dados estes que permitirão localizar áreas de poluição ambiental⁴.

A baixa concentração de elementos como Hg, As, Cd e Pb em amostras biológicas requer o uso de técnicas altamente sensíveis, tais como GF AAS, ICP OES, ICP-MS, CV AAS e HG AAS, usada para Hg e As respectivamente¹²⁴. Em revisões recentes sobre determinação de elementos traço em amostras biológicas^{7,125} foi enfatizado que as principais técnicas utilizadas para essas análises são: espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), GF AAS, ICP OES e ICP-MS. A técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)¹²⁶ desponta como uma técnica muito promissora nesse cenário. A HR-CS GF AAS oferece uma grande vantagem para a análise direta de sólidos, pois uma vez que toda linha analítica se torna visível é possível detectar e evitar interferências espectrais. O sistema também oferece novas possibilidades de correção destas interferências facilitando o desenvolvimento de métodos¹²⁶.

Na análise de traços, a integridade da informação química é fortemente dependente dos passos iniciais do método analítico. Assim, uma seleção adequada do procedimento de preparo da amostra é essencial. Korn *et al.*⁶ publicaram uma revisão a respeito de procedimentos de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos utilizando técnicas

espectroanalíticas. Entre os métodos mais aplicados para o preparo de amostras de alimentos estão: dissolução via seca, dissolução via úmida, preferencialmente assistida por micro-ondas, suspensões, particularmente com assistência por ultrassom e a análise direta de sólidos. Essa revisão também mostrou que há uma tendência para métodos que minimizem a manipulação da amostra e o consumo de reagentes, reduzindo assim o risco de contaminação e o tempo de preparo. A análise direta de sólidos está ganhando importância no campo da análise de alimentos, pois oferece uma alta sensibilidade, evitando o uso de reagentes agressivos como ácidos minerais, tornando possível a microanálise. Além disso, pode ser aplicada para uma análise rápida de *screening* (rastreamento), como por exemplo, pescado *in natura*.

Os métodos de suspensão para determinação de metais em pescado e materiais biológicos por GF AAS geralmente envolvem o uso de água, ácido nítrico, Triton X-100, peróxido de hidrogênio e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) sendo a maioria auxiliada por ultrassom¹²⁷⁻¹³³. Cid *et al.*¹³¹ quantificaram Pb em amostras de pescado e algas marinhas utilizando suspensão formada por uma mistura 3% (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) e 0.3% Triton X-100. Para auxiliar na formação da suspensão foi utilizado agitação magnética e aquecimento por micro-ondas. Huang et al. 132 também determinaram Pb em músculo de peixe espada utilizando suspensão formada por uma mistura de (nitrato de amônio, peróxido de hidrogênio e Triton X-100), com o auxílio de ultrassom. Neste trabalho foi testado dois tipos de modificadores para o GF AAS (nitrato de paládio e nitrato de amônio). O método foi validado utilizando o CRM DORM-2. Wibetoe et al. 133 desenvolveram um trabalho analisando cádmio, níquel e cobalto em amostras de plantas utilizando uma suspensão formada por ácido nítrico e Triton X-100. Neste trabalho a moagem foi realizada em moinho criogênico e foi avaliada a influência do tamanho das partículas na suspensão desenvolvida. Foram testadas amostras com partículas que variaram de 20 a 160µm de diâmetro. Também foi medido o tempo de agitação no ultrassom (1 a 60 min). Os resultados apresentaram diferença no que tange o tamanho da partícula das amostras na suspensão, além do aumento na precisão quanto utilizado o tempo de 60 min no ultrassom. A amostragem por suspensão, mesmo sendo um procedimento simples e rápido, pode afetar a precisão e a exatidão das análises devido ao tamanho de partícula e a falta de homogeneidade da amostra^{133,134}.

Em procedimentos de digestão ácida e solubilização alcalina em amostras de pescado por GF AAS encontram-se como os reagentes mais utilizados a mistura de HNO₃ e H₂O₂ em micro-ondas, além do uso de TMAH¹³⁵⁻¹⁴⁷. O TMAH é uma base forte, solúvel em água e em solventes orgânicos, que sob suaves condições de aquecimento¹⁴³ solubiliza completamente

tecidos de origem animal. Apesar do método de digestão ser o mais utilizado neste tipo de análise, o mesmo requer o uso de reagentes com alto grau de pureza e custo elevado, é extremamente demorado, aumento dos riscos de contaminação e também exige prática e experiência do analista¹⁴⁴. A digestão em micro-ondas é um método de alto custo e também requer o uso de reagentes com alto grau de pureza, entretanto é mais rápida e apresenta menores riscos de contaminação por ser realizada em sistema fechado. Costa *et al.*¹⁴⁵ recentemente investigaram o uso da digestão ácida assistida por micro-ondas para determinar Cd em diversas espécies de pescado utilizando GF AAS. Aygun *et al.*¹⁴⁶ publicaram um trabalho utilizando a dissolução via úmida com uma mistura de HNO₃ e HClO₄ para determinar Fe, Mn, Zn, Cu, Pb e Cd em amostras de anchovas. Bilandžić *et al.*¹⁴⁷ também utilizando uma mistura de HNO₃ e H2O₂ em micro-ondas determinaram Cd, Cu e Pb em diversos tipos de peixes do mar Adriático.

Um problema na determinação de arsênio total em amostras de pescado e espécies marinhas é a presença da arsenobetaína, espécie orgânica de difícil decomposição química e metabolicamente estável¹⁴⁸. A arsenobetaína está presente em grande quantidade nas espécies marinhas, e muitas vezes, é considerada a espécie absoluta de As nessas amostras¹⁴⁹. Para a determinação de As total, em alguns métodos, é obrigatório a conversão de todas as espécies orgânicas em inorgânicas. Consequentemente, a alta estabilidade da arsenobetaína torna-se algo desfavorável¹⁴⁹. Digestões utilizando agentes oxidantes fortes, ácidos e altas temperaturas são necessárias para a completa degradação da AB¹⁵⁰. Em certos casos, mesmo com a utilização destes reagentes aliados a altas temperaturas, a AB não é degradada totalmente e os resultados encontrados para a concentração total de arsênio são menores que o valor real^{151,152}.

Narukawa *et al.*¹⁵¹ realizaram um interessante estudo das condições necessárias para a completa conversão das espécies orgânicas de As em inorgânicas. Vários sistemas de digestão, incluindo micro-ondas e sistemas abertos foram propostos, e a conversão das espécies foi monitorada através da técnica de HPLC-ICP OES. As técnicas de GF AAS e HYD-ICP OES foram utilizadas na determinação de As total. Como esperado, a decomposição da arsenobetaína só foi possível utilizando altas temperaturas e a presença de HClO₄. As concentrações de As total determinadas por GF AAS foram inferiores aos valores certificados quando as digestões não conseguiram degradar totalmente a AB. Segundo os autores, devido às diferenças de comportamento entre as espécies de As presentes em amostras ambientais e organismos marinhos, erros são esperados na determinação por GF AAS se estas diferentes espécies (incluindo a AB não degradada) estiverem presentes.

Slejkovec *et al.*¹⁵³ também realizaram um estudo mostrando diferentes digestões ácidas e os correspondentes graus de conversão da AB em espécie inorgânica. Em conversões incompletas da AB, valores abaixo dos certificados para As total foram encontrados utilizando técnicas de geração de hidretos. Goessler *et al.*¹⁵⁴ também chegaram a resultados semelhantes a Slejkovec *et al.*¹⁵³, concluindo que a AB possui resistência a degradação no ponto de ebulição do ácido nítrico.

Apesar de vários métodos propostos na literatura, os resultados são contraditórios ou não conclusivos para determinação de As em amostras de pescado. Este fato indica a necessidade de uma cuidadosa investigação no desenvolvimento de novos métodos para determinação de As neste tipo de amostra.

2.7. ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS POR GF AAS

A fim de evitar procedimentos de pré-tratamento de amostra, que muitas vezes são demorados e suscetíveis à contaminação, a técnica de análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite vem sendo utilizada. Esta técnica, onde a amostra é introduzida diretamente na plataforma do forno de grafite, é considerada uma importante estratégia analítica. De todas as técnicas espectroscópicas, a GF AAS é talvez, a mais adequada para a análise direta de amostras sólidas, uma vez que esta técnica permite a transformação térmica da amostra no atomizador e, com a assistência de modificação química, a simplificação da matriz, durante as diversas etapas do programa eletrotérmico. Além disso, a SS-GF AAS permite a calibração com padrões aquosos e a utilização de modificadores químicos permanentes¹⁵⁵. Esta técnica também apresenta alta sensibilidade, limites de detecção extremamente baixos devido à ausência de diluição, menor risco de contaminação e aumento da velocidade de análise, devido a não necessidade de decomposição da amostra 8. Conforme já discutido, a mínima manipulação da amostra faz da SS-GF AAS ideal para uma análise rápida de screening e aplicações de rotina, além da possibilidade de microanálise¹⁵⁵. Este método tem por principal objetivo aumentar o número de amostras analisadas por tempo e a confiabilidade dos resultados, além de reduzir o custo da análise. Apesar de todas estas vantagens, a análise direta de amostras biológicas, devido à sua complexidade, exige uma cuidadosa investigação das interferências utilizando CRMs ou métodos convencionais, como a digestão ácida. Também, para a SS, o preparo de amostras biológicas, como pescados e frutos do mar, requer algum tipo de pré-tratamento como a homogeneização e liofilização.

Dentre os parâmetros que devem ser cuidadosamente avaliados na análise direta de sólidos refere-se a homogeneidade da amostra. Os materiais biológicos, geológicos e ambientais são caracteristicamente não homogêneos⁸. Quando os tamanhos de partículas são reduzidos com a moagem da amostra, a precisão aumenta. Por essa razão vários procedimentos de homogeneização, tais como pulverização, mistura e peneiramento vem sendo utilizados no preparo de amostra para análise direta de sólidos. ¹⁵⁶ A respeito aos materiais biológicos ou matrizes que apresentam alto teor de gordura, a homogeneização é realizada utilizando moagem criogênica. A vantagem está na rapidez e dependendo do material processado as partículas obtidas podem obter tamanhos inferiores a 150 μm¹⁵⁷.

Alguns autores utilizaram a técnica de amostragem direta de sólidos por GF AAS em diferentes matrizes biológicas. 127,158-165 Carioni et al. 127 determinou As em uma amostra candidata a material de referência (atum) utilizando suspensão em água. Neste trabalho também foi investigado parâmetros de homogeneidade e segregação do analito. As amostras foram moídas em moinho criogênico e peneiradas em diâmetros que variaram de 100-500µm. Damin et al. 158 determinaram Cd e Pb em amostras de carne bovina in-natura. Neste estudo, o prétratamento de amostra foi quase inexistente e para validação dos resultados foi utilizado um método convencional de digestão ácida. Também para comparação dos resultados, as amostras liofilizadas foram comparadas com os resultados das amostras in-natura (método proposto). Nomura et. al¹⁶⁵ determinaram Cd e Pb em uma amostra de fígado bovino com o objetivo de investigar a influência na secagem (estufa, micro-ondas e liofilização) e o processo de moagem (moinho de bolas e moinho criogênico) nesse tipo de amostra. Neste trabalho os autores concluíram que diferentes tipos de procedimentos utilizados no preparo da amostra influenciaram na micro-homogeneidade da mesma. Os resultados obtidos com SS-GF AAS foram comparados utilizando um método convencional de digestão ácida. Lücker et. al. publicaram diversos trabalhos envolvendo a análise direta de tecidos de animais por espectrometria de absorção atômica com corretor de sinal de fundo baseado no efeito Zeeman. Os autores observaram que a distribuição dos elementos traço nesse tipo de amostra é praticamente homogênea. Estes estudos foram realizados utilizando amostras de tecidos de fígado^{159,160} e rim¹⁶¹. Foi determinado Pb em tecido de músculo contaminado por resíduos de armas de fogo¹⁶² e Cd em músculo equino. ¹⁶³Lucker e Schuirer ¹⁶⁴ investigaram as possíveis fontes de erros nas determinações por SS-GF AAS em tecido animal in natura.

Até o presente momento não foi encontrado na literatura nenhum trabalho sobre o desenvolvimento de métodos para a determinação de cádmio e chumbo em pescado *in natura*

por análise direta de sólidos utilizando GF AAS, além da publicação decorrente deste trabalho intitulada "Determination of cadmium and lead in fresh fish samples by direct sampling electrothermal atomic absorption spectrometry" Anal. Methods, 2013, 5, 6416–6424. 166

2.8. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE EM FONTE DE LINHA (LS-GF AAS)

A técnica de LS-GF AAS é uma poderosa ferramenta na determinação de elementos de baixas concentrações para diferentes tipos de amostras. Os atomizadores eletrotérmicos possuem a vantagem de ter uma alta sensibilidade e utilizar pequenos volumes de amostra (geralmente entre 10-50 μL). É uma técnica seletiva e quando comparada com a F AAS, a LS-GF AAS apresenta algumas vantagens como: maior sensibilidade, uso de menores quantidades de amostra e menor susceptibilidade a interferências físicas¹²⁴. Slavin instituiu o conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) desencadeando uma melhora considerável nas análises em LS-GF AAS. O conceito STPF consiste, fundamentalmente na atomização do analito utilizando plataformas de L'Vov, alta velocidade de aquecimento na etapa de atomização, interrupção do gás interno durante a atomização, uso de absorvância integrada nas medidas dos sinais analíticos e emprego de modificadores químicos¹²⁴.

A importância do uso de modificadores químicos em LS-GF AAS está relacionada com a volatilização do interferente e/ou o elemento a ser determinado tornar-se mais refratário, permitindo assim, um aumento na temperatura de pirólise. Consequentemente, há uma diminuição no espalhamento de radiação e formação de moléculas na etapa de atomização quando a medida é realizada¹⁶⁷.

Os modificadores químicos ideais devem apresentar algumas características importantes como: 168,169 a) Aumento na temperatura de pirólise; b) Ser de fácil obtenção e alto grau de pureza; c) Não contribuir para um aumento nos valores de absorção de fundo (BG); d) Não interferir na vida útil do atomizador; e) Não contribuir para um aumento dos limites de detecção; f) Modificadores permanentes devem-se manter no atomizador o maior tempo possível; g) Não deve conter os analitos que serão determinados na análise; h) Aplicação em diversas matrizes.

O modificador químico mais utilizado na determinação de elementos traço por LS-GF AAS em amostras ambientais e biológicas é a mistura nitrato de paládio e magnésio^{5,170}. Por ser aplicável a uma ampla variedade de matrizes e para uma grande maioria de elementos, essa

mistura Pd/Mg é considerada como modificador "universal". Ortner et al. 171 publicaram a respeito dos diversos tipos de modificadores utilizados por LS-GF AAS e seus mecanismos de ação.

O modificador permanente é um tipo de modificador que se encontra presente no tubo de grafite na forma de um depósito, consequentemente é eliminada a necessidade de mistura com a amostra, evitando riscos de contaminação 172. Este modificador é depositado nas paredes do tubo de grafite ou sobre a plataforma de L'vov por eletrodeposição ou pipetagem da solução do modificador. Em seguida o tubo é submetido a um tratamento térmico, permitindo seu uso em várias análises, sem a necessidade de um novo recobrimento. Elementos do grupo da platina (Ir, Pd, Pt, Rh, Ru), assim como, elementos formadores de carbetos (Zr, W, Nb, Ta), vêm sendo utilizados como modificadores permanentes 172.

2.9. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica com Fonte de Linha (LS AAS) é uma técnica seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução porque as fontes de emissão de linha consistem em lâmpadas desenvolvidas para emitir radiação específica para cada elemento. Já a Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS) utiliza uma única fonte de radiação, um monocromador de alta resolução e um detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Este fato representa um grande avanço para o desenvolvimento de métodos analíticos, pois cada pixel é equipado com um amplificador individual onde o equipamento opera com 512 detectores individuais. Desta forma, é possível obter-se uma série de informações que não são disponíveis em instrumentos convencionais. Há três diferentes maneiras de visualizar os dados em HR-CS AAS: o tradicional sinal transiente, o sinal de absorvância integrada versus comprimento de onda e a imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda ^{126,173}.

O único equipamento comercializado no mercado pela Analytik Jena (Alemanha) possui um software que permite processamento total dos dados após a leitura e a capacidade de corrigir automaticamente eventos que afetam de maneira similar todos os pixels do detector (contínuos). Outro método de correção interessante do equipamento é o método dos mínimos quadrados que subtrai o espectro do fundo do espectro de determinada amostra, no caso em que haja

sobreposição espectral e temporal do sinal do analito e do fundo molecular. Para a realização deste tipo de correção, um espectro de referência é gerado usualmente por um sal e o fundo estruturado é artificialmente produzido. Por exemplo, para gerar um espectro de referência de PO, prepara-se uma solução de um sal de fosfato qualquer. Este espectro obtido a partir da vaporização do sal de fosfato pode ser subtraído do espectro da amostra pelo software, gerando um sinal que deve conter apenas o sinal do analito ^{126,173}.

As características da técnica, que incluem elevada capacidade de correção de fundo e visibilidade de toda a região espectral na vizinhança da linha analítica, são especialmente atrativas para o desenvolvimento de métodos com análise direta de sólidos, principalmente para amostras de matrizes complexas¹²⁶.

Zmozinki, A.V. OBJETIVOS

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de SS-GF AAS na determinação de As, Cd e Pb em amostras de pescado *in natura* e analisar as espécies de As e Hg em amostras de pescado e frutos do mar utilizando as técnicas de HPLC-ICP-MS e HPLC-UV-CV-AFS, respectivamente. Em relação a análise direta de sólidos, o trabalho teve como foco o desenvolvimento de métodos analíticos exatos, rápidos e sensíveis que possam ser aplicados rotineiramente na determinação desses metais dentro do âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

Objetivos específicos investigados neste trabalho:

3.1. DETERMINAÇÃO DE As, Cd E Pb EM AMOSTRAS DE PESCADO UTILIZANDO SS-GF AAS:

- ✓ Estudar o comportamento e aplicação de modificadores químicos para a estabilização térmica dos elementos As, Cd e Pb;
- ✓ Investigar a possibilidade do uso de padrões aquosos para calibração;
- ✓ Otimizar o método para (SS-GF AAS) e estabelecer parâmetros analíticos;
- ✓ Validar os métodos desenvolvidos usando materiais de referência certificados e digestão das amostras;
- ✓ Após validação dos métodos, aplicar na determinação de As, Cd e Pb em amostras de pescado in natura.

3.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE AS E Hg EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR UTILIZANDO HPLC-ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS:

 ✓ Preparar as amostras adequando-se ao sistema aplicado para as análises das espécies de As e Hg; Zmozinki, A.V. OBJETIVOS

 ✓ Otimizar os parâmetros referentes ao sistema de HPLC e do sistema de atomização e detecção ICP-MS; também ao sistema de HPLC e do sistema de atomização e detecção UV-CV-AFS;

- ✓ Aplicar as análises de especiação de As e Hg em amostras de pescado e frutos do mar in natura;
- √ Validar as análises das espécies de As e Hg utilizando materiais de referência certificados.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1. Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite com Fonte de Linha (LS-GF AAS)

Para a determinação de As, Cd e Pb em amostras de pescado foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Zeenit 650P (Analytik Jena AG, Alemanha), equipado com tubo de grafite com aquecimento transversal e sistema de correção de fundo por efeito Zeeman, empregando um campo magnético de 0,8 T. Para medida dos sinais de absorvância foram usadas lâmpadas de cátodo oco de As, Cd e Pb (Photron, Victoria, Austrália). O experimento foi realizado utilizando tubos de grafite recobertos piroliticamente para amostragem sólida (Analytik Jena, Part No. 407-152.316) e plataformas de grafite para amostragem sólida (Analytik Jena, Part No. 407-152.023). Os parâmetros instrumentais utilizados estão apresentados na Tabela III. O programa de temperatura do forno de grafite é apresentado na Tabela IV.

Tabela III. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de As, Cd e Pb por SS-GF AAS.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Fenda espectral (nm)
Arsênio	193,7	6,0	0,8
Cádmio	228,8	2,0	0,5
Chumbo	283,3	3,0	0,5

Tabela IV. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de As, Cd e Pb em amostras de pescado utilizando SS-GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de Gás (L min ⁻¹)
Secagem 1	110	15	20	2
Secagem 2	150	20	45	2
Pirólise	$1200^a/1100^b/800^c$	300	35	2
Atomização	$2400^a/2200^b/1700^c$	FP*	8	0
Limpeza	2400	1000	8	2

a: Arsênio; b: Chumbo; c: Cádmio; *FP = Potência máxima (do inglês: "full power")

4.1.2. Espectrômetro de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua e com Forno de Grafite (HR-CS-GF AAS)

Para a determinação de As também foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo contrAA 700 (Analytik Jena AG, Alemanha) equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão operando em modo hotspot, cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. O equipamento conta com um monocromador duplo echelle e um detector com arranjo CCD. Cada pixel é equipado com um amplificador individual, de maneira que o instrumento opera de fato com 588 detectores completamente independentes, 200 dos quais são utilizados para fins analíticos. A linha analítica utilizada foi 193,696 nm com resolução espectral de 1,2 pm por pixel. Para a avaliação do sinal analítico foi considerado o somatório da absorvância integrada de três pixels do centro da linha (CP, do inglês *center pixel*) mais cada um dos seus pixels adjacentes CP ± 1. Foi utilizado o modo de correção (IBC, do inglês *iterative background correction*). O experimento foi realizado utilizando tubos de grafite recobertos piroliticamente para amostragem sólida (Analytik Jena, Part No. 407-A81.303) e plataformas de grafite para amostragem sólida (Analytik Jena, Part No. 407-152.023). O programa de temperatura do forno de grafite é apresentado na Tabela V.

Tabela V. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de arsênio em amostras de pescado liofilizadas por SS-HR-CS GF AAS.

Etapa	-	Rampa	Tempo de permanência	Fluxo de Gás (L min ⁻¹)		
-	(°C)	$(^{\circ}\text{C s}^{-1})$	(s)	Purga	Adicional	
Secagem 1	110	15	20	2	0	
Secagem 2	150	20	45	2	0	
Ash	600	200	30	0	2	
Pirólise	1200	300	35	2	0	
Atomização	2400	FP*	8	0	0	
Limpeza	2400	1000	8	2	0	

Gás de purga: argônio; gás adicional: ar comprimido

Para a pesagem das amostras utilizou-se uma micro-balança (Sartorius, Göttingen, Alemanha) com exatidão de 0,001 mg. Os valores das massas pesadas foram automaticamente transmitidos para o computador para calcular a "absorvância integrada normalizada" (absorvância integrada calculada para 1 mg de amostra) depois de cada medida, com exceção do As onde a absorvância integrada calculada foi de 0,1 mg de amostra. A normalização da absorvância integrada é utilizada em SS-GF AAS para comparar sinais, devido ao fato de ser quase impossível e desnecessário introduzir sempre a mesma massa de amostra em uma série de medidas. Para inserir as plataformas no atomizador foi utilizado um acessório de amostragem sólida manual SSA 6 (Analytik Jena AG, Alemanha).

Como gás de purga, empregou-se argônio com pureza de 99,996% (White Martins, Brasil) com vazão de 2,0 L min⁻¹, durante todas as etapas, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi interrompido. Para a etapa de "ash", foi utilizado ar comprimido como gás adicional com vazão de 2,0 L min⁻¹. Os padrões aquosos e o modificador químico foram injetados manualmente na plataforma de SS utilizando uma micropipeta.

^{*}FP = Potência máxima (do inglês: "full power")

4.1.3. Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) e Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado ao ICP-MS

Para a determinação de As e Hg total em amostras de pescado e frutos do mar foi utilizado um ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent, Alemanha), equipado com nebulizador microconcêntrico (BURGENER Ari Mist HP) e cela de colisão para a eliminação de interferências. Foi utilizado gás hélio na cela de colisão. Na Tabela VI estão descritos os principais parâmetros instrumentais utilizados do ICP-MS.

Tabela VI. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de As e Hg por ICP-MS.

Potência de radiofrequência	1550 W
Vazão do gás do plasma (Ar)	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar (Ar)	0,32 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,85 L min ⁻¹
Cela de colisão (He)	3,8 mL min ⁻¹
"Sampler and skimmer"	Niquel
Nebulizador	BURGENER Ari Mist HP
Câmara de Nebulização	Ciclônica
m/z monitorado	⁷⁵ As, ²⁰² Hg, ²⁰¹ Hg, ⁹ Be, ¹⁰³ Rh e ²⁰⁵ Tl

Para separação das espécies de As foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao ICP-MS (HPLC-ICP-MS), com bomba quaternária modelo Agilent 1200, desgaseificador a vácuo e amostrador automático. O intervalo de volume de injeção é de 0,01 μL a 2000 μL, com taxa de fluxo que pode variar de 0,001 a 10 mL min⁻¹ e incrementos de 0,001 mL min⁻¹. A bomba apresenta uma faixa de pressão de trabalho de 0 a 400 bar. A coluna utilizada para a cromatografia de troca aniônica é Hamilton PRP-X100 com fase estacionária de troca aniônica e suporte polimérico de poli (estireno-divinilbenzeno) trimetilamonia. Para a troca catiônica a coluna utilizada é Zorbax 300-SCX, com fase estacionária de troca catiônica polar, que consiste em uma fração de ácido sulfônico aromático unido covalentemente a partículas de 5 μm ZORBAX PSM 300 (microesferas porosas de sílica de 300 angstrom) através da ligação Si-O-Si. A Tabela VII apresenta as principais características das colunas e as

condições cromatográficas de trabalho para a separação das espécies de As. A saída da coluna do HPLC foi conectada através do tubo capilar PEEK no nebulizador do ICP-MS (Agilent 7500ce). A intensidade do íon m/z 75 (⁷⁵As) foi monitorada utilizando o software (TRA) *Time Resolved Analysis*. Adicionalmente as intensidades dos íons m/z 77 (⁴⁰Ar³⁷Cl) e m/z 35 (³⁵Cl) foram monitoradas para detectar possíveis interferências de cloreto (⁴⁰Ar³⁵Cl).

Tabela VII. Características das colunas e as condições cromatográficas para a separação das espécies de arsênio.

	Troca aniônica	Troca catiônica
Coluna -	Hamilton PRP-X100 (250 mm x 4,1	Zorbax 300-SCX. (250 mm x 4,6
Colulia	mm, 10 μm)	mm, 5 μm)
Pré-coluna	Hamilton PRP-X100 (20 x 2,0 mm, 10	Zorbax 300-SCX. (12,5 mm x
Pre-colulia	μm)	4,6mm, 5 μm)
Fase móvel	20 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , pH= 5,8	20 mM piridina, pH=2,6
Fluxo	1,5 mL min ⁻¹	1,5 mL min ⁻¹
Volume de injeção	100 μL	50 μL
Temperatura da coluna	24 °C	24 °C
Pressão	145 bar	152 bar
Espécies de As	As(III), DMA, MA e As(V)	AB, AC e TMAO
Eluição	Isocrática, 8 min	Isocrática, 9 min

4.1.4. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Acoplado ao Espectrômetro de Fluorescência Atômica com Geração de Vapor Frio e Radiação UV (HPLC-UV-CV-AFS)

Para análise das espécies de Hg foi utilizado um HPLC acoplado ao UV-CV-AFS, com bomba quaternária modelo Agilent 1100 equipado com um injetor de amostras manual (Rheodyne 7725i). Foi injetado um volume de 100 μL dos padrões e dos extratos analisados. As espécies de mercúrio (Hg²+ e CH₃Hg+) foram separadas utilizando uma coluna RP-C₁8 (ODS

Hypersyl 250 mm × 4,6 mm, 5 μm, Thermo Hypersil-Keystone). Também foi utilizado um fotoreator, que contém uma lâmpada UV (Heraeus TQ 150) operando em 150W de potência e um tubo de PTFE (politetrafluoretileno) em espiral (0,5mm de diâmetro e 12 metros de comprimento) onde ocorre a fotorreação. Todo este sistema está revestido em papel alumínio para proteger o operador da radiação UV proveniente da lâmpada e aumentar a eficiência da radiação UV por meio de sua reflexão. A etapa de redução ocorreu em um gerador de vapor frio (CV) 10004 (PS Analytical, Orpington, Reino Unido), no qual o efluente é misturado com o agente redutor. O vapor de mercúrio metálico obtido chega ao separador gás-líquido e atinge o detector arrastado por um fluxo de gás argônio e seco em uma membrana (Perma Pure) com gás nitrogênio. Um detector de fluorescência atômica modelo Merlin 10023 (PS Analytical), foi utilizado nas medidas de mercúrio. A aquisição dos dados utilizou o programa Pendragon 1.0.

4.1.5. Outros equipamentos

As amostras de músculo de pescado do Brasil foram liofilizadas em um liofilizador ModulyonD Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation, EUA) e moídas em um micromoinho A11 Basic (IKA – Werke, Alemanha). Para a digestão das amostras foram utilizados dois fornos de micro-ondas: Top Wave (Analytik Jena AG, Alemanha) e Ethos Touch Control (Milestone, Itália). Este último também foi utilizado para os métodos de extração das amostras. Para as digestões alcalinas utilizou-se uma chapa de aquecimento Fisatom 1600 W (São Paulo, Brasil). Na centrifugação dos extratos para a análise de especiação de As foi utilizada uma centrífuga Modelo JP Selecta Centronic 95.

4.2. LIMPEZA DO MATERIAL

Os frascos destinados ao armazenamento das soluções foram previamente descontaminados e secos para posterior uso. Uma solução de HNO₃ ~ 3 mol L⁻¹ foi introduzida nestes recipientes, ficando em contato com o ácido por um período de 24 horas para a completa descontaminação. Após retirar a solução ácida, os frascos foram lavados por pelo menos três vezes com água destilada e deionizada. O restante da vidraria utilizada no preparo das soluções foi inserido em um banho de HNO₃ (3 mol L⁻¹), seguindo o mesmo procedimento de lavagem escrito anteriormente.

4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções e amostras foram preparadas com reagente de grau analítico e com água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA), resistividade específica 18,2 MΩ cm a 25°C acoplado a um destilador de água (Fisatom, São Paulo, Brasil). O ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizado no preparo das soluções padrão de calibração e também na digestão, foi previamente purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição em um destilador sub-boiling com tubo de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha).

Foram preparadas soluções estoque aquosas de 1000 mg L⁻¹ de arsênio (As₂O₃), cádmio (Cd(NO₃)₂) e chumbo (Pb(NO₃)₂) (Specsol, São Paulo, Brasil) e acidificadas com ácido nítrico (0,014 mol L⁻¹). As soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir de uma série de diluições das soluções estoque e utilizados na análise com SS-GF AAS e SS-HR-CS GF AAS.

A mistura da solução de modificador de nitrato de paládio e magnésio foi preparada a partir das soluções estoque: 10.0 ± 0.2 g L⁻¹ Pd em 15% (v/v) HNO₃ (Merck, Alemanha), 10.0 ± 0.2 g L⁻¹ Mg em 17% (v/v) HNO₃ (Merck, Alemanha) e Triton X–100 (Union Carbide). A concentração final da solução de modificador foi 1.0 g L⁻¹ Pd + 0.6 g L⁻¹ Mg + 0.06% Triton X-100 para As e 0.5 g L⁻¹ Pd + 0.3 g L⁻¹ Mg + 0.05% Triton X-100 para Cd e Pb. Foi adicionado um volume de 15 μ L do modificador sobre a amostra na plataforma para As e 10 μ L para Cd e Pb. O surfactante Triton X-100 é empregado para diminuir a tensão superficial da solução de modificador e conferir uma melhor interação deste sobre a amostra sólida¹⁷⁴.

Para as análises de As e Hg total utilizando ICP-MS foram preparadas as soluções de trabalho a partir de uma série de diluições da solução estoque padrão 1000 mg L⁻¹ de As e Hg (Inorganic Ventures Standards, Virgínia, EUA).

Dihidrogênio fosfato de amônio (Panreac, p.a.) e piridina (Scharlau, p.a.) foram utilizados no preparo das fases móveis do método de especiação de As utilizando HPLC-ICP-MS.

Foram preparadas soluções estoque aquosas de 1000 mg As L⁻¹ utilizadas na análise de especiação de arsênio: As(III), (As₂O₃, NIST, EUA); As(V), (Na₂HAsO₄.7H₂O, Carlo Erba, Itália); MA, ((CH₃)AsO(ONa)₂.6H₂O, Carlo Erba, Itália); DMA, ((CH₃)₂AsNaO₂.3H₂O, Fluka, EUA); AC, ((CH₃)₃As⁺(CH₂) CH₂OHBr⁻, CNRS, Vernaison, França); TMAO, ((CH₃)₃AsO, Argus Chemicals, Itália) e o material de referência certificado da AB, ((CH₃)₃As⁺CH₂COO-NMIJ, Japão)) como solução padrão, NMIJ CRM 7901-a.

Ácido pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) (Fluka, p.a.), acetato de amônio, (Merck, p.a.) e metanol grau HPLC (Panreac, p.a.) foram utilizados no preparo da fases móvel do método de especiação de Hg utilizando HPLC-UV-CV-AFS.

As soluções estoque padrão (1000 mg Hg L⁻¹) utilizadas na análise de especiação de mercúrio foram preparados da seguinte forma: mercúrio inorgânico, (HgCl₂,Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em 1% (v/v) HNO₃ (Panreac, Hiperpur) e metilmercúrio, (CH₃HgCl, Carlo Erba, Itália). Para geração de vapor frio foi utilizado uma solução 1,5% (m/v) SnCl₂ (estanho(II) dihidratado) (Panreac, p.a.) em HCl 4% (v/v) (Panreac, Hiperpur).

Para a digestão das amostras utilizaram-se: H₂O₂ 30% (v/v) (Merck, Alemanha), HNO₃ 14M (Merck, Alemanha), Hidróxido de Sódio 2 Mol L⁻¹ (Nuclear, São Paulo, Brasil), TMAH 25% (m/v) (C₄H₁₂NOH, 91,15 g mol⁻¹, Aldrich, Alemanha).

4.4. MATERIAIS DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS

Para avaliação da exatidão dos métodos desenvolvidos neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais de referência certificados: DORM-3 (Proteína de peixe, NRC, Canadá), DOLT-4 (Fígado de cação, NRC, Canadá), TORT-2 (Lagosta, NRC, Canadá), NIST SRM 2976 (Tecido de Mexilhão) e NIST SRM 1566b (Tecido de ostras) ambos da (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA), BCR-627 e BCR-463 (Tecido de Atum), ERM-BC211 (Arroz) e ERM-CE278 (Tecido de mexilhão), todos da Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre, Geel, Bélgica. A amostra 9th PT foi utilizada como material de referência (CRL-ISS, Itália). As amostras de músculo de pescado (Pargo, Merluza, Pescada, Atum e Abrótea) foram cedidas pelo Laboratório de Metais Traço e Contaminantes - LANAGRO/RS do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inicialmente essas amostras foram lavadas com água ultra-pura, cortadas e homogeneizadas em um liquidificador¹⁷⁵. As amostras homogeneizadas foram separadas e uma parte foi congelada e outra parte foi liofilizada, conforme será descrito a seguir. As mesmas foram armazenadas a -10°C em sacos plásticos limpos e descongeladas em temperatura ambiente antes de cada análise. As amostras de pescado e frutos do mar da Espanha foram fornecidas pela Agência de Saúde Pública de Barcelona (ASPB, Barcelona, Espanha). Todas as amostras foram lavadas com água ultra-pura, cortadas e homogeneizadas em um liquidificador. Após homogeneização, as amostras foram armazenadas a -10°C em sacos plásticos limpos e descongeladas em temperatura ambiente antes de cada análise.

4.5. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, MERCÚRIO, CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADAS E *IN NATURA* USANDO SS-GF AAS, SS-HR-CS-GF AAS E ICP-MS.

4.5.1. Análise direta de sólidos

4.5.1.1. Amostras in natura

As massas das amostras de pescado *in natura* variando entre 2 a 8 mg, dependendo da concentração do analito, foram pesadas diretamente nas plataformas de grafite. Logo após, foi adicionado o modificador químico sobre as mesmas e introduzidas no forno de grafite por SS-GF AAS para determinação de Cd e Pb. Observou-se um decréscimo nos valores de massa durante a pesagem devido à perda de umidade, então a estratégia foi considerar o primeiro peso, desconsiderando a perda de massa em relação ao tempo. Todas as amostras foram pesadas e analisadas 10 vezes. A concentração do analito foi calculada em μg por g da substância *in natura* (μg g⁻¹ *in natura*). O tempo total de análise para cada amostra foi cerca de 50 minutos.

4.5.1.2. Amostras liofilizadas e CRMs

As amostras de músculo de pescado brasileiras foram liofilizadas por um período de 7 horas. Após esse procedimento, foram moídas em moinho vibratório e peneiradas em uma malha de poliéster de 85 μm para melhorar a distribuição granulométrica. A massa de amostra (variação de 0,01 a 3 mg) foi pesada diretamente na plataforma, depois foi adicionado 10-15 μL do modificador químico sobre a amostra e introduzidas no forno de grafite por SS-GF AAS para determinação de Cd, Pb e As. A calibração foi realizada utilizando a técnica de calibração com padrões aquosos.

4.5.2. Métodos de digestão

4.5.2.1. Digestão em forno micro-ondas

O método de digestão ácida assistida por micro-ondas foi baseado no artigo de Shah *et al*¹⁴¹. Foram pesadas aproximadamente (0,1-1,0 g) de amostras diretamente nos tubos de Teflon. Foram adicionados 8 mL de ácido nítrico bidestilado e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Após esse procedimento, os tubos foram levados diretamente ao forno de micro-

ondas submetidos ao seguinte programa de aquecimento: temperatura ambiente a 90°C (mantendo-se 10 minutos em 90°C), 90°C a 120°C (mantendo-se 10 minutos em 120°C) e 120°C a 190°C (mantendo-se 10 minutos em 190°C). Rampas de 5 minutos. Depois dos tubos frios, os produtos da digestão foram transferidos para balões volumétricos e o volume completado a 25 mL com água ultrapura. O tempo total de digestão foi de aproximadamente 3 horas, incluindo o tempo de resfriamento e pesagem das amostras. Esse método foi aplicado utilizando CRMs, amostras de pescado *in natura* e liofilizadas para determinação de As, Cd, Pb e Hg utilizando as seguintes técnicas: GF AAS (As, Cd e Pb) e ICP-MS (As e Hg).

4.5.2.2. Mineralização das amostras de pescado in natura

O método utilizado para mineralização das amostras de pescado *in natura* e CRMs foi o MET N° 400/01 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 175. Aproximadamente 5 g de amostra de pescado *in natura* foram pesadas em cadinhos de 50 mL. Após foram adicionados 4 mL de nitrato de magnésio 50% (v/v) e levadas para a estufa a 90 °C por 8 horas. Posteriormente as amostras foram colocadas na mufla utilizando o programa de aquecimento descrito na Tabela VIII, onde permaneceram por um período de 6 horas. Depois das amostras já frias, foi colocado 1 mL de HNO₃ 50% (v/v) e os cadinhos levados para a chapa de aquecimento em uma temperatura de 100 °C por uma hora. Posteriormente, as amostras foram levadas novamente a mufla utilizando o programa de aquecimento descrito na Tabela IX, permanecendo por um período de 60 min. Depois das amostras já frias, adicionou-se 10 mL de HC14,5 mol L⁻¹. Os produtos da digestão foram transferidos em balões volumétricos e o volume completado a 25 mL com água ultrapura. O tempo total de digestão é de aproximadamente três dias. Esse método foi aplicado utilizando o CRM TORT-2 para determinação de As por HG AAS e realizado no Laboratório de Análise de Tracos do LANAGRO - Porto Alegre.

Tabela VIII. Programa da mufla utilizado para secagem e calcinação das amostras de pescado *in natura*.

Rampas	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	100	20	10
2	180	10	30
3	250	20	60
4	350	20	90
5	450	15	30
6	550	15	150

Tabela IX. Programa da mufla utilizado para secagem das amostras de pescado.

Rampas	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	250	10	30
2	550	15	30

4.5.2.3. Digestão Alcalina com NaOH

O método de digestão alcalina utilizado foi baseado no trabalho de Geng *et al*¹⁰. Primeiramente 50 mg do material certificado TORT-2 foi pesado diretamente em tubos Falcom de 50 mL e adicionados 5 mL de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹. A seguir, os tubos foram levados a uma chapa de aquecimento, onde permaneceram em banho-maria por quatro horas, com temperaturas entre 90-95°C. Após este período, os produtos da digestão foram transferidos para balões volumétricos e o volume completado a 10 mL com água ultra-pura. O tempo total de digestão foi de aproximadamente 5 horas. Esse método foi aplicado utilizando material de referência certificado TORT-2 para determinação de As por GF AAS.

4.5.2.4. Digestão Alcalina com TMAH

O método de digestão alcalina utilizado foi baseado no trabalho de Pereira *et al*¹³⁹. Primeiramente 50 mg do material certificado TORT-2 foi pesado diretamente em tubos Falcom de 50 mL e adicionados 5 mL de TMAH 25% (m/v). A seguir, os tubos foram levados a uma chapa de aquecimento, onde permaneceram em banho-maria por seis horas, com temperaturas de 90-95 °C. Após este período, os produtos da digestão foram transferidos para balões volumétricos e o volume completado a 10 mL com água ultra-pura. O tempo total de digestão foi de aproximadamente 7 horas. Esse método foi aplicado utilizando material de referência certificado TORT-2 para determinação de As por GF AAS.

4.6. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO E MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR IN NATURA E LIOFILIZADAS UTILIZANDO HPLC-ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS.

4.6.1. Determinação do teor de umidade

A umidade das amostras foi determinada em triplicata. Foram secas aproximadamente 0.5~g das amostras de pescado e frutos do mar *in natura* em uma estufa com temperatura de $102\pm3~^{\circ}\text{C}$ até peso constante. A umidade das amostras apresentou uma variabilidade de 45% a 88%. Os resultados são expressos em massa seca.

4.6.2. Análise das espécies de arsênio por HPLC-ICP-MS

O método de extração das espécies de As foi baseado em estudos de Llorente-Mirandes *et al.*^{176,177} utilizando forno de micro-ondas e posterior análise por HPLC-ICP-MS. As amostras e os CRMs foram pesados (0,1 – 1,0 g) diretamente em tubos de Teflon. Foi adicionado 10 mL de uma solução contendo 0,2% (v/v) de ácido nítrico e 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio. Após esse procedimento, os tubos foram levados diretamente ao forno de micro-ondas com o seguinte programa de aquecimento: temperatura ambiente a 55 °C (mantendo-se 10 minutos em 55 °C), 55 °C a 75 °C (mantendo-se 10 minutos em 75 °C) e 75 °C a 95 °C (mantendo-se 20 minutos em 95 °C) com rampas de 5 minutos. Após, os extratos foram centrifugados por 25 minutos (3500rpm) e os sobrenadantes filtrados com filtros de politereftalato de etileno (Figura 7), (Chromafil PET, Macherey – Nagel, tamanho do poro de 0,45 μm). Este método de

extração oxida completamente As(III) em As(V), sem a conversão das espécies orgânicas de As em arsênio inorgânico. O iAs foi identificado e quantificado como As(V) nos extratos, comparando o pico cromatográfico dos extratos com o pico da solução padrão de arsenato. A determinação de As total nos extratos foi realizada utilizando ICP-MS. Dois métodos cromatográficos foram utilizados para a separação das espécies de As. As(III), As(V), DMA e MA foram analisados por cromatografia de troca aniônica. AB, AC e TMAO foram analisados por cromatografia de troca catiônica. As características das colunas e as condições cromatográficas para a separação das espécies de arsênio estão descritas na Tabela VII. As espécies de As nos extratos foram identificadas por comparação dos tempos de retenção com seus respectivos padrões. Foram utilizadas curvas de calibração externas para quantificar As(III), As(V), MA e DMA (1-10 μg L⁻¹), AB, AC e TMAO (1-50 μg L⁻¹). Todos os extratos foram analisados em triplicata.

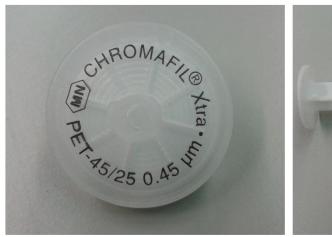




Figura 7. Filtros de politereftalato de etileno (Chromafil PET, Macherey – Nagel, tamanho do poro de 0,45 μm) e seringa utilizados no momento da filtragem dos extratos de pescado e frutos do mar para posterior análise em HPLC-ICP-MS.

4.6.3. Análise das espécies de mercúrio por HPLC-UV-CV-AFS

O método de extração das espécies de Hg foi baseado em estudos de Ibañez-Palomino $et\ al.^{116}$ utilizando micro-ondas e posterior análise por HPLC-UV-CV-AFS. As amostras e os CRMs foram pesados $(0,1-1,0\ g)$ diretamente em tubos de Teflon. Foi adicionado $10\ mL$ de uma solução de HCl 4 mol L^{-1} . Após esse procedimento, os tubos foram levados diretamente

ao forno de micro-ondas com o seguinte programa de aquecimento: temperatura ambiente a 100 °C (mantendo-se 10 minutos em 100 °C) com rampa de 5 minutos. Após, os extratos foram filtrados com papel filtro (Whatman 40) (Figura 8). As espécies de Hg nos extratos foram identificadas por comparação dos tempos de retenção com seus respectivos padrões. Foram utilizadas curvas de calibração externa para quantificar CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ (2,5-100 μg L⁻¹). As características da coluna e a condição cromatográfica para a separação das espécies de Hg estão descritas no item 4.1.4. Todos os extratos foram analisados em triplicata. A fase móvel utilizada é uma solução 20% (m/v) (mistura de APDC/acetato de amônio) e 80% (v/v) metanol grau HPLC (pH 5,5).



Figura 8. Extratos das amostras de pescado e frutos do mar para posterior análise em HPLC-UV-CV-AFS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos com os métodos desenvolvidos para a determinação de Cd e Pb utilizando CRMs e amostras de pescado *in natura* (abrótea, pescada, merluza, atum e pargo) utilizando amostragem direta de sólidos em GF AAS.

Também serão apresentados os resultados obtidos com os métodos desenvolvidos para determinação de As em amostras de pescado liofilizadas utilizando amostragem direta de sólidos em LS-GF AAS e HR-CS-GF AAS.

Para avaliação da exatidão dos métodos propostos para a determinação de As em amostras de pescado serão apresentados os resultados obtidos para o CRM TORT-2 com a digestão ácida assistida em micro-ondas, digestão alcalina e a mineralização, este último realizado no MAPA. Em relação aos métodos propostos para a determinação de Cd e Pb em amostras de pescado *in natura* serão apresentados os resultados obtidos com a digestão em micro-ondas.

Serão discutidas as vantagens e desvantagens entre os diferentes métodos de análise estudados, em termos de sensibilidade, precisão e exatidão.

Em uma segunda parte do trabalho serão apresentados os resultados obtidos no laboratório Qualitat en la Determinación de Contaminants Prioritaris I Avaluació de Llur Comportament (QÜESTRAM), onde a doutoranda realizou estágio de Doutorado Sanduíche. Serão apresentados dados da análise de especiação de arsênio e mercúrio em amostras de pescado e frutos do mar *in natura* por HPLC-ICP-MS e HPLC-UV-CV-AFS respectivamente.

5.1. DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE PESCADO IN NATURA UTILIZANDO SS-GF AAS.

5.1.1. Seleção do comprimento de onda

Inicialmente foi realizada uma investigação com o uso da linha ressonante primária para chumbo (217,0 nm), utilizando amostras de pescado *in-natura* e materiais de referência certificados, uma vez que as concentrações desse analito nas amostras são baixas. Apesar da alta sensibilidade, os limites de detecção utilizando essa linha não são melhores, do que com o uso da linha alternativa de 283,3 nm. Os limites de detecção utilizando a linha alternativa de 283,3 nm são aproximadamente cinco vezes menores que comparados com a linha primária

desse analito, além disso, as amostras de pescado *in- natura* têm suas concentrações abaixo do limite de detecção utilizando a linha primária. Sendo assim, optou-se por utilizar a linha alternativa de 283,3 nm. Este fato está em concordância com a literatura, Welz *et al.* ¹²⁴ explicaram que apesar da linha de 217,0 nm ser mais sensível que 283,3 nm, a mesma não apresenta limites de detecção melhores devido à razão sinal/ruído ser ruim.

Para cádmio foi utilizada linha espectral primária de 228,8 nm por apresentar sensibilidade significativamente maior, consequentemente foi possível analisar massas pequenas de amostras, não apresentando interferência espectral significativa com temperaturas de pirólise maiores do que 700 °C.

5.1.2. Programa de aquecimento e modificadores

O programa de aquecimento foi otimizado para a determinação direta de Pb e Cd em amostras de pescado *in-natura* e nos materiais certificados DORM-3 e TORT-2. O material de referência certificado TORT-2 foi utilizado somente para a otimização dos parâmetros instrumentais do Pb, enquanto que para Cd foi utilizado o material certificado DORM-3, pois o primeiro apresentou concentrações muito altas para Cd. Foram utilizadas duas temperaturas de secagem com taxas de aquecimento relativamente lentas e tempos de espera longos (patamar) como mostra a Tabela IV, apresentada no item 4.1. Isso se fez necessário devido ao alto teor de umidade das amostras, também para que houvesse um aquecimento homogêneo, evitando assim o espirramento e transbordamento do modificador químico.

Também foi investigado o uso da mistura de paládio e magnésio como modificador químico. O modificar Pd/Mg foi proposto por Schlemmer e Welz¹⁷⁸ e é conhecido como modificador universal¹⁷⁹. Este modificador químico é utilizado em diversos tipos de amostras e analitos^{147,158,180,181}. Neste trabalho o modificador químico foi pipetado sobre a amostra logo após as pesagens das mesmas.

Foi realizado um estudo preliminar da quantidade de massa de modificador necessária para estabilizar termicamente o Pb e o Cd (Figura 9). Foram utilizados volumes de 5 a 20 μL, equivalentes a (2,5 a 10 μg de Pd e 1,5 a 6 μg de Mg), com temperaturas de pirólise (900 °C e 800 °C) e atomização (2100 °C e 1700 °C) para o Pb e Cd, respectivamente. Para os materiais certificados TORT-2 e DORM-3 o maior sinal analítico para uma mesma quantidade de amostra é obtido com uma massa de 5 μg de Pd e 3 μg de Mg para ambos os analitos, provavelmente devido a uma melhor distribuição e interação entre o modificador e amostra nessa condição.

Para os padrões aquosos de Pb e Cd, o sinal analítico não apresentou uma variação significativa nos valores de absorvância integrada. Consequentemente, a massa de modificador utilizada nos estudos posteriores para chumbo e cádmio são 5 μg de Pd e 3 μg de Mg. Também foi adicionado 0,05% (v/v) de Triton X-100 a esses dois compostos na mistura.

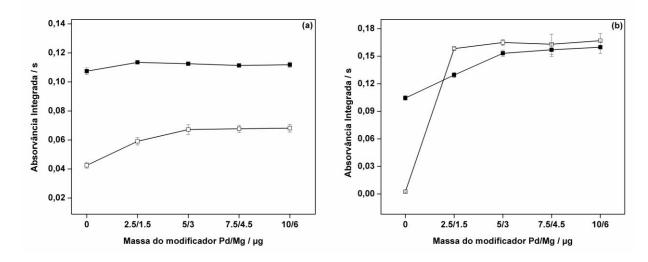


Figura 9. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,05% (v/v) de Triton X-100 para (a) Pb e (b) Cd. (□) absorvância integrada normalizada para 1 mg de TORT-2 para o Pb (a) e 0,2 mg de DORM-3 para o Cd (b). (■) 0,5 ng Pb (a) e 50 pg Cd (b) em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. Ta: 2200 °C e Tp: 900 °C para Pb; Ta:1900 °C e Tp:800 °C para Cd.

Foram estabelecidas curvas de temperatura de pirólise para o CRM TORT-2 e para o padrão aquoso 0,5 ng de Pb, com e sem a adição do modificador Pd/Mg. A temperatura de pirólise teve início em 700 °C utilizando material certificado TORT-2. Temperaturas abaixo de 700 °C não puderam ser usadas devido a altas mudanças no sinal de fundo ocasionado pela matriz. Isto ocorre porque a eliminação da matriz a baixas temperaturas de pirólise é incompleta, consequentemente a fumaça gerada durante a etapa de atomização resultará no espalhamento da radiação 167. Pode-se observar através das curvas mostradas na Figura 10, que o modificador Pd/Mg possibilita temperaturas de pirólise mais altas para o padrão aquoso. Os valores de absorvância integrada para o material certificado foram normalizados para uma massa de 1 mg. Foi escolhida a temperatura de pirólise de 1100 °C, a mesma foi utilizada em todos os experimentos posteriores. As curvas são apresentadas na Figura 10.

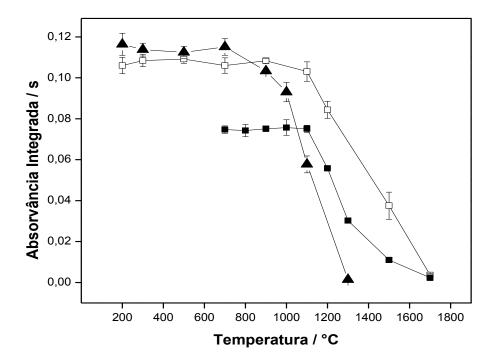


Figura 10. Curvas de pirólise para Pb; (■) normalizada para 1 mg de TORT-2 com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (□) 0,5 ng Pb em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (▲) 0,5 ng Pb em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. Ta: 2200 °C.

Na Figura 11 são apresentadas as curvas de temperatura de pirólise para o CRM DORM-3 e para o padrão aquoso 50 pg de Cd, com e sem a adição do modificador Pd/Mg. Pode-se observar através das curvas mostradas na Figura 11, que o modificador Pd/Mg possibilita temperaturas de pirólise mais altas para o padrão aquoso. Os valores de absorvância integrada para o material certificado foram normalizados para uma massa de 0,2 mg. Como pode ser visto na Figura 11 o Cd torna-se estável até 800 °C tanto para o material certificado como para o padrão aquoso, portanto a temperatura de pirólise escolhida foi de 800 °C.

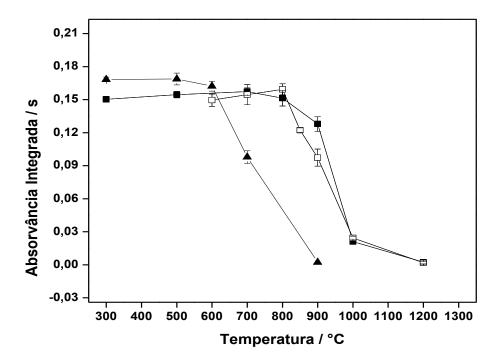


Figura 11. Curvas de pirólise para Cd; (□) normalizada para 0,2 mg de DORM-3 com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100, (■) 50 pg Cd em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ com 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0,05% (v/v) Triton X-100 (▲) 50 pg Cd em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃, Ta: 1900 °C.

Perfis de absorvância e absorção do sinal de fundo também foram considerados na otimização das condições do programa de aquecimento para cádmio e chumbo; alguns sinais de atomização e absorção de fundo estão apresentados na Figura 12. Como pode ser observado pela Figura 12 há uma similaridade no formato do pico da amostra sólida comparada com o padrão aquoso, tanto para o Cd, quanto para o Pb. As temperaturas de atomização de 2200 °C para Pb e 1700 °C para Cd foram escolhidas com base na sensibilidade e no formato do sinal analítico.

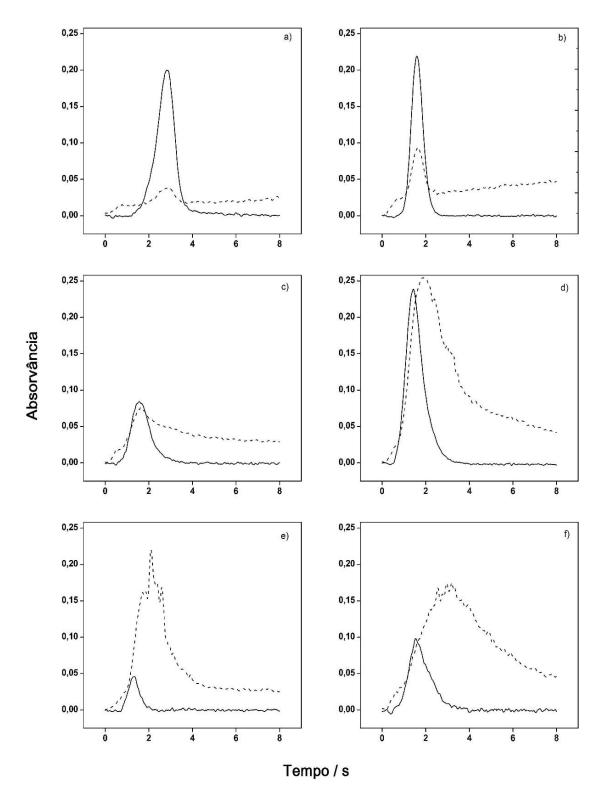


Figura 12. Perfis de absorvância para Pb e Cd usando SS-GF AAS. As linhas cheias representam absorção atômica (AA) e as linhas pontilhadas representam o sinal de fundo (BG). (a) 1 ng Pb; (b) 50 pg Cd; (c) TORT-2; (d) DORM-3 (e) Amostra M2 *in natura* Pb (f) Amostra M2 *in natura* Cd. Ta = 2200 °C – Tp = 1100 °C para Pb; Ta = 1700 °C e Tp = 800 °C, (modificador Pd/Mg/Triton X-100).

5.1.3. Massa de amostra e erros envolvendo a análise direta de sólidos

Alguns autores^{124,182} relataram sobre as dificuldades encontradas no método de análise direta de amostra sólida, entre elas, a necessidade da pesagem de pequenas massas de amostra, problemas de micro-homogeneidade, dificuldades de introdução da amostra, e o limite do tamanho de amostra. Além do mais, Coskun and Akman¹⁸³ reportaram que se a massa não pode ser mantida constante, pode haver algum erro devido ao uso de diferentes massas de amostra.

A fim de avaliar os erros de pesagem, as amostras *in natura* foram secas para eliminar a umidade e pesadas até peso constante. As concentrações de cádmio e chumbo para as amostras secas foram corrigidas para peso úmido da amostra, a fim de expressar os resultados em μg por g de substância *in natura* (μg g⁻¹ *in natura*) e os dois métodos poderem ser comparados. As amostras de pescado *in natura* foram homogeneizadas antes da análise como descrito no item 4.4. Imediatamente após a homogeneização, uma parte da amostra foi transferida para sacos plásticos descontaminados e todo o ar foi removido para evitar a perda de umidade. Os plásticos foram abertos somente no momento da pesagem para reduzir o risco de perda de umidade. O procedimento de pesar as amostras *in natura* foi baseado em utilizar a primeira pesagem, desconsiderando a perda de massa com o tempo como proposto por Lücker e Schuier^{158,164}.

Para as amostras *in natura*, as massas pesadas variaram entre 2 e 8 mg e para as amostras secas a variação foi de 0,5 e 3 mg como apresentadas na Tabela X. A massa máxima de amostra *in natura* pesada na plataforma foi de 8 mg, enquanto que para as amostras secas foram utilizadas massas menores devido à concentração mais alta obtida nessa condição.

Tabela X. Coeficientes de variação das medidas de cádmio e chumbo em amostras de pescado liofilizadas e *in natura* utilizando SS-GF AAS.

Analito	Amostra	Faixa de massa/ mg <i>in natura</i>	Faixa de massa/ mg seca	In natura CV % (n = 10)	Seca CV % (n = 6)
	M1	2,0-5,0	0,8-3,0	13	4
Pb	M2	2,0-8,0	1,5-3,0	20	9
	M3	2,0-4,8	0.8 - 1.7	13	6
	M1	2,0-4,5	0,5-2,0	9	7
Cd	M2	2,0-4,3	0,5-2,2	10	6
	M3	2,0-4,7	1,0-2,0	11	6

Os CV das medidas de Pb e Cd em três amostras estão representados na Tabela X. Para ambos os analitos, a média do CV é aproximadamente 12% para amostras *in natura* e aproximadamente 6% para as amostras secas, o que está de acordo com os valores reportados pela literatura utilizando amostras de carne *in-natura*¹⁵⁸, rins de aves *in natura*¹⁶¹ e com a análise direta de sólidos para amostras secas. Os valores de CV encontrados neste trabalho foram considerados aceitáveis em relação a complexidade da matriz biológica e o uso de amostras de pescado *in-natura*, a qual evita processos de liofilização, moagem e peneiramento.

Para analisar a influência da massa de amostra pesada sobre a plataforma na linearidade de resposta do sinal analítico, foram realizadas medidas variando-se a massa de TORT-2 para Pb e DORM-3 para Cd. As massas de amostras tiveram uma variação de 0,1 e 3 mg. Os coeficientes de correlação das curvas são $R^2 \cong 0,98$ para Pb e $R^2 \cong 0,97$ para Cd.

Também foram realizadas medidas variando-se a massa de duas amostras de pescado *in natura* para Cd e Pb. Os coeficientes de correlação das curvas são $R^2 \cong 0.96$ para Pb e $R^2 \cong 0.98$ para Cd.

5.1.4. Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito para determinação de Pb e Cd em amostras de pescado *in natura* utilizando SS-GF AAS estão expressos na Tabela XI. Foram construídas curvas de calibração utilizando soluções padrão aquosas na faixa de concentração de $5-100~\mu g~L^{-1}$ (0,05-1,0 ng) para Pb e $1-8~\mu g~L^{-1}$ (10-80 pg) para Cd.

Os seguintes parâmetros de mérito foram determinados para a avaliação do método proposto: massa característica (m₀), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Os valores de LD e LQ foram calculados para a massa máxima de amostra *in natura* investigada para o Cd e Pb (8 mg). Os valores de m₀ estão em concordância com os valores reportados na literatura¹²⁴. Neste trabalho os valores de LD e LQ são melhores que os valores reportados na literatura para ambos os analitos em amostras de carne *in natura*¹⁵⁸. Adicionalmente os valores de LD e LQ encontrados nesse trabalho estão abaixo do nível máximo permitido para Pb 0,20 e 0,50 mg kg⁻¹ para Cd em pescado estabelecido pelo PNCRC⁴. O tempo de vida útil dos fornos de grafite e das plataformas para sólido foram aproximadamente 500 e 250 queimas, respectivamente, para ambos os analitos.

Tabela XI. Parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Cd e Pb utilizando SS-GF AAS.

Analito	Eq. de Regressão Linear	\mathbb{R}^2	m ₀ /pg	LD ^a (n=10) μg kg ⁻¹	LQ ^a (n=10) μg kg ⁻¹
Pb	A = -0.0040 + 0.223 m (ng)	0,9971	16	1,0	3,2
Cd	A = 0.0024 + 0.0027 m (pg)	0,9991	1,0	0,2	0,6

^a Baseado na técnica de "resposta de massa zero" e calculado para 8 mg de amostra.

5.1.5. Resultados Analíticos

A viabilidade do uso da calibração utilizando padrões aquosos foi investigada através da determinação de Cd e Pb em quatro materiais de referência certificados (SRM 2976, DORM-3, TORT-2 e 1566B) e um material de referência 9th PT. Dois CRMs também foram digeridos com o objetivo de investigar a exatidão do método de digestão adotado para validação do método desenvolvido. Os resultados encontram-se nas Tabelas XII e XIII. O valor da concentração de Pb encontrado com a SS-GF AAS, não difere significativamente do valor certificado a um nível de 95% de confiança segundo o teste *t*-student. Os mesmos resultados estatísticos foram obtidos para cádmio.

Tabela XII. Determinação de Cd em materiais de referências certificados usando SS-GFAAS.

Amostra	Concentração de Cd/ μ g g ⁻¹ (média \pm desvio padrão)				
	Valor certificado	SS (n=6)	Digestão (n=3)		
SRM 2976	$0,820 \pm 0,160$	0.812 ± 0.022	-		
DORM- 3	$0,290 \pm 0,020$	$0,288 \pm 0,013$	$0,293 \pm 0,003$		
9 th PT	0.314 ± 0.090	$0,309 \pm 0,013$	-		

Tabela XIII. Determinação de Pb em materiais de referências certificados usando SS-GFAAS.

A	Concentração de Pb/ μg g ⁻¹ (média ± desvio padrão)				
Amostra	Valor certificado	SS (n=6)	Digestão (n=3)		
TORT-2	$0,350 \pm 0,130$	$0,342 \pm 0,010$	$0,370 \pm 0,020$		
SRM 2976	$1,190 \pm 0,180$	$1,191 \pm 0,076$	-		
SRM 1566b	$0,308 \pm 0,009$	$0,301 \pm 0,017$	-		
DORM- 3	$0,395 \pm 0,005$	$0,392 \pm 0,014$	$0,397 \pm 0,015$		

A boa concordância entre os resultados confirma a possibilidade de que padrões aquosos possam ser usados para a determinação de Cd e Pb em amostras de pescado *in natura* com o método desenvolvido e a exatidão do método de digestão adotado.

Com o objetivo de verificar a exatidão dos resultados para as amostras de pescado *in natura* uma comparação de métodos foi realizada. Primeiramente, a técnica de SS-GF AAS foi aplicada para a análise de amostras de pescado liofilizadas uma vez que, os resultados obtidos com os materiais de referência certificados demonstraram essa viabilidade, conforme visto nas (Tabelas XII e XIII) e também de acordo com a literatura¹⁶⁵. As amostras liofilizadas foram corrigidas para peso úmido para comparação com as concentrações obtidas das amostras *in natura*. Consequentemente os resultados obtidos para as amostras liofilizadas e *in natura* foram validadas utilizando o método de digestão em micro-ondas. As concentrações obtidas usando os diferentes métodos estão descritos nas Tabelas XIV e XV.

Tabela XIV. Resultados analíticos obtidos por SS-GF AAS para Cd em amostras *in natura* e secas e GF AAS em amostras digeridas. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de Cd em amostra *in natura* (média ± desvio padrão, n=3)

Amostvo	Concentração de Cd/ μg g ⁻¹ in natura ^a (média ± desvio padrão)				
Amostra –	In natura (n=10)	Seca (n=6)	Digestão (n=3)		
M1	$0,0130 \pm 0,0012$	$0,0125 \pm 0,0013$	$0,0122 \pm 0,0015$		
M2	$0,0116 \pm 0,0012$	$0,0115 \pm 0,0010$	$0,0110 \pm 0,0002$		
M3	$0,0121 \pm 0,0013$	$0,0124 \pm 0,0011$	$0,0110 \pm 0,0005$		
M4	$0,0093 \pm 0,0010$	$0,0088 \pm 0,0006$	-		
M5	< LQ	< LQ	-		
M6	< LQ	< LQ	-		

^a Todos os valores são baseados em peso úmido (µg g⁻¹ de substância *in natura*)

Tabela XV. Resultados analíticos obtidos por SS-GF AAS para Pb em amostras *in natura* e secas e GF AAS em amostras digeridas. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de Pb em amostra *in natura* (média ± desvio padrão, n=3)

Amostra –	Concentração de Pb/ μ g g ⁻¹ in natura ^a (média \pm desvio padrão)				
Amostra –	In natura (n=10)	Seca (n=6)	Digestão (n=3)		
M1	$0,0265 \pm 0,0035$	$0,0246 \pm 0,0015$	$0,0241 \pm 0,0012$		
M2	$0,0168 \pm 0,0034$	$0,0158 \pm 0,0022$	$0,0168 \pm 0,0019$		
M3	$0,0242 \pm 0,0031$	$0,0247 \pm 0,0025$	$0,0247 \pm 0,0034$		
M 4	$0,0209 \pm 0,0019$	$0,0209 \pm 0,0028$	-		
M5	< LQ	< LQ	-		
M6	< LQ	< LQ	-		

^a Todos os valores são baseados em peso úmido (µg g⁻¹ de substância *in natura*)

Todas as amostras apresentaram concentrações abaixo do nível máximo de cádmio e chumbo estabelecidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura do Brasil⁴ e pelas normas da Comunidade Européia¹²⁰.

A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada para os dados das Tabelas XIV e XV comprovando que os resultados não são significativamente diferentes a um nível de confiança de 95%.

Todos os resultados foram satisfatórios, mostrando que o método desenvolvido para determinação direta de Cd e Pb em amostras de pescado *in natura* podem ser aplicados em análise de rotina.

5.2. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADAS UTILIZANDO SS-GF AAS.

Para o estabelecimento dos parâmetros instrumentais como temperaturas do programa de aquecimento, tempo, taxa de aquecimento e vazão do gás de purga utilizou-se o material de referência certificado TORT-2. Foi utilizada a linha analítica primária para a determinação de As nas amostras de pescado liofilizadas.

Foi investigado o uso da mistura de paládio e magnésio como modificador químico. O uso de paládio e magnésio como modificador é mencionado como essencial para a determinação de As em amostras marinhas. Segundo reportado na literatura, o mesmo consegue estabilizar com êxito as formas orgânicas e inorgânicas do As até temperaturas de 1200 °C utilizando GF AAS¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Outros modificadores também tem sido reportados na literatura como a mistura de Pd/Ni na determinação de As em organismos marinhos utilizando GF AAS⁶⁵.

Na Figura 13 é apresentado o estudo da quantidade de massa de modificador necessária para estabilizar termicamente o As. Pode-se observar que para o CRM TORT-2, o maior sinal analítico para uma quantidade máxima de amostra é obtido com uma massa de 15 μg de Pd e 9 μg de Mg. Com o padrão aquoso, o sinal analítico não apresentou uma variação significativa nos valores de absorvância integrada. Considerando estes resultados, a massa de modificador utilizada nos estudos posteriores foi de 15 μg de Pd e 9 μg de Mg. Também foi adicionado 0,06% (v/v) de Triton X-100 a esses dois compostos na mistura. O modificador químico foi pipetado sobre a amostra logo após as pesagens das mesmas.

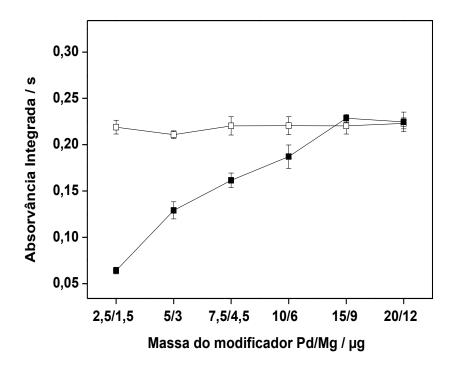


Figura 13. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,06% (v/v) de Triton X-100. (\blacksquare) absorvância integrada normalizada para 0,1 mg de TORT-2, (\square) 1 ng As em 10 μ L de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. Tp: 1000 °C, Ta: 2400 °C.

Foram estabelecidas curvas de pirólise (Figura 14) utilizando o CRM TORT-2 e padrão aquoso 1 ng de As. Pode-se observar pela Figura 14 que a temperatura de pirólise ideal é de 1200°C para o TORT-2 e para o padrão aquoso. Para TORT-2 não foi possível a leitura do sinal utilizando temperaturas de pirólise inferiores a 300 °C. O mesmo foi observado por Giacomelli *et al.*¹⁸⁷ onde as quantificações de As utilizando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio em material de referência DORM-1 só foi possível utilizando temperaturas de pirólise superiores a 300 °C. A fim de eliminar ou minimizar os efeitos da matriz e sinal de fundo de forma eficiente foi escolhida a maior temperatura de pirólise (Tp = 1200 °C). A mesma foi utilizada para todos os experimentos seguintes com soluções-padrão e amostras de pescado liofilizadas.

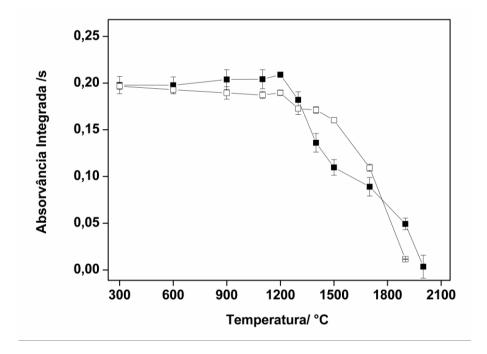


Figura 14. Curvas de pirólise para As (\blacksquare) normalizada para 0,1 mg de TORT-2 (\square) 1 ng As em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ Ta: 2400 °C. Nos dois casos foi utilizado 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico.

Com base na sensibilidade e na forma de pico a temperatura de atomização escolhida foi de 2400 °C. Os perfis de absorvância tanto para TORT-2 como para o padrão aquoso podem ser vistos na Figura 15.

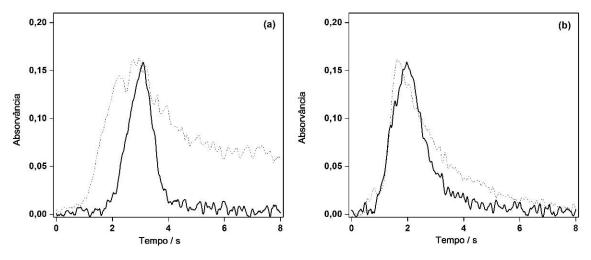


Figura 15. Perfis de absorvância para As usando SS-GF AAS. As linhas cheias representam absorção atômica e linhas pontilhadas sinal de fundo. a) 1ng As b) TORT-2. Ambos em presença de 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico. Ta: 2400 °C, Tp: 1200 °C.

Para verificar a influência da massa de amostra pesada sobre a plataforma na linearidade de resposta do sinal analítico foram realizadas medidas variando-se a massa de amostra. O estudo foi realizado com o CRM TORT-2. Os resultados obtidos estão expressos nas Figuras 16 e 17.

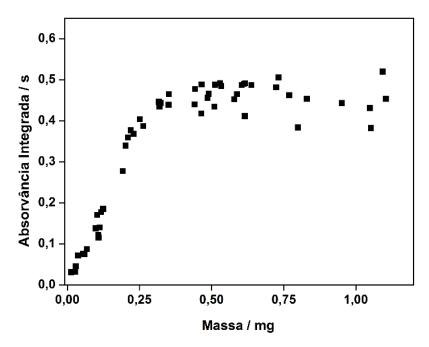


Figura 16. Influência da massa de TORT-2 na linearidade de resposta utilizando 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C; Ta 2400 °C.

Pode-se observar através da Figura 16 que fazendo medidas acima da massa de 0,4 mg o sinal de absorvância se mantém estável, mesmo aumentando a massa de amostra, indicando que há uma forte influência da matriz. A Figura 17 mostra apenas a parte linear da curva.

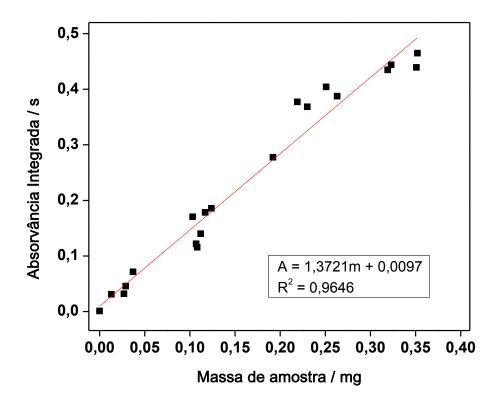


Figura 17. Influência da massa de TORT-2 na linearidade de resposta utilizando 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

Estudo semelhante também foi realizado com as amostras M1, M2 e M4. A amostra M1 apresentou boa linearidade com massas até 0,25 mg (R^2 = 0,9476), a amostra M2 com massas até 0,28 mg (R^2 = 0,9533) e a amostra M4 com massas até 0,30 mg (R^2 = 0,9678).

5.2.1. Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para determinação de As em amostras de pescado liofilizadas utilizando SS-GF AAS estão expressos na Tabela XVI. Foram construídas curvas de calibração utilizando soluções padrão aquosas na faixa de concentração de 15 - 200 µg L⁻¹ (0,15 - 2,0 ng).

Os seguintes parâmetros de mérito foram determinados para a avaliação do método proposto: massa característica (m₀), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A massa característica (m_0) é definida como a massa de analito correspondente a uma absorvância integrada de $0,0044 \ s^{124}$.

O limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser detectado com certo nível de confiança. É calculado pela seguinte equação:

$$LD = 3 \times \sigma branco/S$$

Onde σbranco é o desvio padrão das dez leituras de absorvância do branco (n=10) e S é o coeficiente angular ou inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser quantificado com um nível de exatidão e precisão aceitável¹⁸⁸. É calculado pela seguinte equação:

$$LQ = 10 \times \sigma branco/S$$

As medidas do branco foram realizadas de acordo com a técnica de "massa de resposta zero"⁸, introduzindo repetidamente a plataforma com o modificador químico, e executando um ciclo de atomização regular. Os valores foram calculados para a massa de 0,25mg de amostra.

Tabela XVI. Parâmetros de mérito para a determinação de As por SS-GF AAS.

Equação de regressão linear R ²		m ₀ /	LD ^a (n=10) / μg g ⁻¹	LQ ^a (n=10) / μg g ⁻¹
A = 0.0078 + 0.1656 m(ng)	0,9937	25	0,10	0,34

^a baseado na técnica "massa de resposta zero" e calculado para 0,25 mg de amostra.

O valor de m_0 encontrado está de acordo com a literatura¹²⁴. Os valores de LD e LQ são menores do que os níveis máximos de arsênio (0,50 μg g⁻¹ de As em músculo de pescado) estabelecidos pelas normas brasileiras⁴.

A precisão do método utilizando SS-GF AAS para determinação de As em amostras de pescado liofilizadas foi calculada a partir de seis leituras consecutivas de quatro amostras reais, cinco materiais de referência certificados e um material de referência, e expressa como coeficiente de variação (CV). Os valores de CV estão reportados na Tabela XVII e apresentaram uma variabilidade de 2 a 7%. Já a reprodutibilidade das amostras de pescado digeridas apresentou uma variação de 1% a 4%.

5.2.2. Resultados Analíticos

Na Tabela XVII são apresentados os resultados obtidos na determinação de As em quatro amostras de pescado liofilizadas, cinco materiais de referência certificados e um material de referência utilizando SS-GF AAS.

Tabela XVII. Determinação de As em amostras de pescado liofilizadas utilizando SS-GF AAS e digestão. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n = 3).

		Cor	ncentração de	As (μg g ⁻¹)	
Amostras	Valor certificado (µg g ⁻¹)	SS-GF AAS (n=6)	CV (%)	DIGESTÃO (n=3)	CV (%)
TORT-2	21,6 ± 1,80	$9,4 \pm 0,67$	7	9,4 ± 0,21	2
DORM-3	$6,88 \pm 0,30$	$3,4 \pm 0,23$	7	$2,9 \pm 0,03$	1
SRM 2976	$13,3 \pm 1,80$	$7,4 \pm 0,40$	5	-	-
SRM 1566b	$7,65 \pm 0,65$	$4,3 \pm 0,25$	2	-	-
DOLT-4	$9,66 \pm 0,62$	$4,1 \pm 0,10$	6	-	-
9 th PT	$6,65 \pm 0,71^{a}$	$2,9 \pm 0,14$	5	-	-
M1	-	$17,2 \pm 0,60$	3	$17,5 \pm 0,75$	4
M2	-	$2,5\pm0,16$	6	$1,9 \pm 0,07$	4
М3	-	$1,2 \pm 0,09$	7	$1,1 \pm 0,04$	3
M4	-	$15,0 \pm 0,92$	6	$15,0 \pm 0,54$	4

^a Valor de referência

Os valores obtidos com o método de digestão ácida assistida em micro-ondas também são mostrados na Tabela XVII. Pode-se observar que a concentração obtida para os CRMs apresentou uma diferença significativa do valor certificado de aproximadamente 44% para o TORT-2, 49% para o DORM-3, 55% para o SRM 2976, 56% para o SRM 1566b, 42% para o DOLT-4 e 43% para o 9th PT. Porém os valores obtidos com o método de digestão em micro-ondas para as amostras e os CRMs TORT-2 e DORM-3 não diferem significativamente com os

resultados obtidos utilizando SS-GF AAS a um nível de 95% de confiança conforme o teste *t*-student.

Outros três métodos de digestão foram investigados utilizando o CRM TORT-2. Foram realizados duas digestões alcalinas baseadas nos artigos de Pereira *et al.*¹³⁹ e Geng *et al*¹⁰. Além disso, foi realizada uma mineralização desse material no LANAGRO conforme o item 4.5.2.2, sendo a leitura realizada por HG AAS. Na Tabela XVIII são apresentados os valores do TORT-2 por SS-GF AAS, as duas digestões alcalinas e a mineralização com leitura por HG AAS.

Tabela XVIII. Determinação de As em material de referência certificado TORT-2 por SS-GF AAS, digestões alcalinas por GF AAS e mineralização utilizando HG AAS.

CRM	Concentração de As (μg g ⁻¹)			
	SS (n=6)	NaOH (n=3)	Mineralização (n=3)	TMAH (n=3)
TORT-2	$9,4 \pm 0,67$	$9,7 \pm 0,42$	9.8 ± 0.45	9,6 ± 0,31

Pode-se observar pela Tabela XVIII que os resultados para este material utilizando a amostragem direta de sólidos e as três digestões não diferem significativamente a um nível de 95% de confiança conforme a análise de variância ANOVA. Porém a concentração obtida para os CRMs continua apresentando uma diferença significativa do valor certificado de aproximadamente 55%. Também foram realizados testes de recuperação para os CRMs TORT-2 e DORM-3. Para a realização desses testes foi adicionado padrão de 1ng de As a uma massa de 0,1 mg dos CRMs. Após, foi adicionado o modificador (15,0 μg de Pd + 9,0 μg de Mg em 0,06% de Triton X-100) e realizada as medidas em seis replicatas. Os valores de recuperação encontrados para o TORT-2 e DORM-3 foram: 98 ± 4 e 102 ± 3, (média% ± desvio padrão, n = 6), respectivamente. Pode-se concluir através desses resultados que há algum tipo de interferência, porém não há influência da matriz no padrão adicionado.

5.2.3. Curva de Correlação

Utilizando-se a equação linear da reta: A = 0.0078 + 0.1656m(ng) obtida com padrão aquoso foi realizada a determinação de As nos CRMs. Os resultados obtidos foram sempre inferiores aos certificados, como visto anteriormente, indicando assim a existência de alguma

interferência. As fontes dessas interferências não puderam ser identificadas e nem eliminadas neste trabalho. Deste modo resolveu-se investigar o uso de uma curva de correlação com materiais de referência certificados.

A curva de correlação é uma curva analítica obtida através da utilização de materiais de referência certificados com diferentes quantidades do analito 189.

Para a construção da curva de correlação foram utilizados os seguintes materiais: DOLT-4 (Fígado de peixe), DORM-3 (Proteína de peixe), TORT-2 (Lagosta), NIST SRM 2976 (Tecido de Mexilhão) e NIST SRM 1566b (Tecido de ostras). O programa de temperatura utilizado foi o mesmo utilizado anteriormente, empregando-se em média 0,1 mg dos CRMs, na faixa de concentrações de As entre 0,0 e 21,6 µg g⁻¹, com adição de modificador Pd/Mg. Os valores de absorvâncias foram normalizados para 0,1 mg de massa de CRM e plotados contra o valor certificado. A curva resultante pode ser vista na Figura 18.

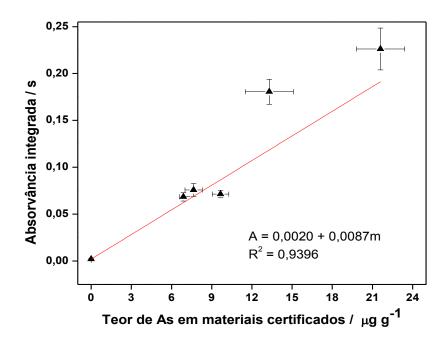


Figura 18. Curva de correlação para As utilizando materiais de referência certificados e 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

Pode-se observar que a coeficiente de correlação (Figura 18) não demonstrou boa linearidade (R²= 0,9396). Este fato pode ter sido ocasionado devido às características intrínsecas dos materiais de referência certificados, ou seja, apresentam diferentes quantidades

de espécies químicas de As. Por exemplo, o CRM TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta) possui aproximadamente 65% de AB, enquanto o CRM 1566b (tecido de ostra) tem apenas 16% ¹⁰. É conhecido que a AB é um material estável quimicamente ¹⁴⁸, e a dependência da sua quantidade pode comprometer a linearidade da curva. Deste modo, considerou-se que a curva de correlação não foi adequada para a determinação de As por SS-GF AAS nas amostras de pescado.

5.3. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADAS UTILIZANDO SS-HR-CS-GF AAS.

Com o objetivo de investigar os problemas de interferências encontrados na determinação direta de As em amostras de pescado e CRMs por SS-GF AAS, optou-se por utilizar o SS-HR-CS-GF AAS. Segundo Santos *et al.* ¹²⁸ o As é tradicionalmente um elemento de difícil determinação por GF AAS devido as interferências espectrais e químicas. Efeitos de fundo estruturado ocasionado por fosfatos são reconhecidos como as principais interferências espectrais na determinação de As em frutos do mar e pescado.

Para a resolução desse tipo de interferência foi realizada uma correção, subtraindo o espectro de fundo (PO) do espectro da amostra de pescado abrótea (M1) através de um algoritmo de mínimos quadrados (LSBC, do inglês *least squares background correction*). Esse método de correção consiste na geração de um espectro de referência, onde o fundo estruturado é artificialmente produzido, usualmente por um sal, no caso foi utilizado o sal $NH_4H_2PO_4$. O espectro de fosfato obtido a partir da vaporização do sal foi subtraído do espectro da amostra pelo software, gerando apenas o sinal atômico de As. Para a construção do espectro de referência foi utilizado 0,4 mg do sal $NH_4H_2PO_4$, o qual foi pesado diretamente na plataforma com adição de $15~\mu g$ $Pd+9~\mu g$ Mg+0,06% (v/v) Triton X-100 e introduzido no forno de grafite por SS-HR-CS-GF AAS. A Figura 19 mostra o espectro do sal $NH_4H_2PO_4$ a uma temperatura de pirólise $1200~^{\circ}C$ e atomização de $2400~^{\circ}C$.

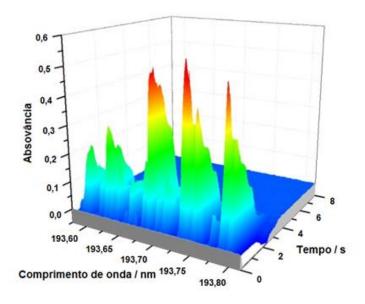


Figura 19. Espectro sal NH₄H₂PO₄ com 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

Nas Figuras 20 e 21 podem ser vistos o perfil analítico da amostra abrótea (M1) e do material de referência certificado TORT-2 (Figura 21) sem a correção e com a correção por LSBC utilizando NH₄H₂PO₄ como espectro de referência.

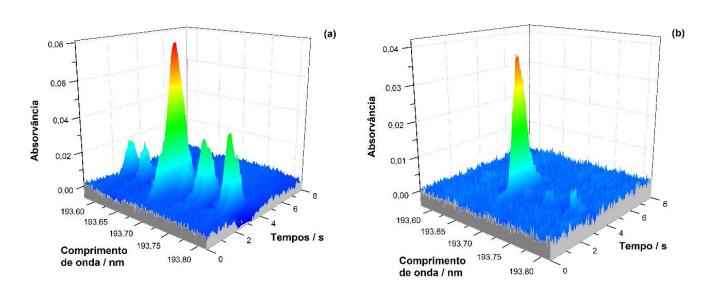


Figura 20. Espectros de absorção da amostra abrótea resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de As 193,696 a) sem a correção; b) com correção por LSBC utilizando $NH_4H_2PO_4$ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

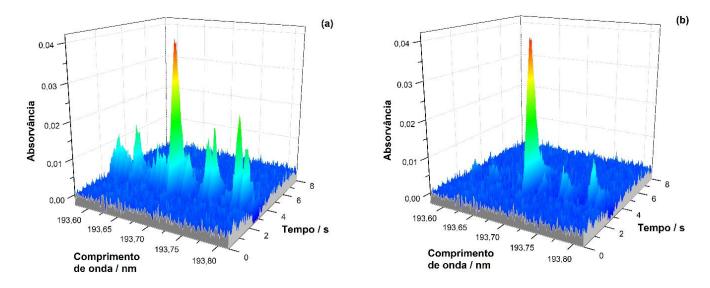


Figura 21. Espectros de absorção do CRM TORT-2 resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de As 193,696 a) sem a correção; b) com correção por LSBC utilizando $NH_4H_2PO_4$ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

Nas Figuras 22a (amostra abrótea) e 23a (TORT-2) podem ser vistos os espectros bidimensionais sem a correção e as Figuras 22b e 23b com a correção por LSBC utilizando NH₄H₂PO₄ como espectro de referência.

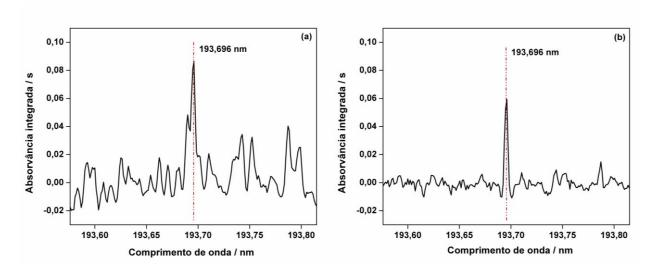


Figura 22. Espectros de absorção na vizinhança da linha analítica de 193,696 nm para a amostra abrótea utilizando SS-HR-CS-GF AAS a) sem correção b) com correção por LSBC utilizando NH₄H₂PO₄ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

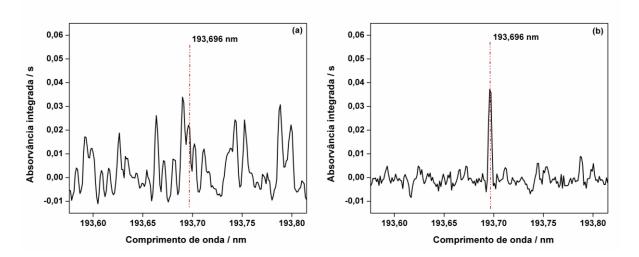


Figura 23. Espectros de absorção na vizinhança da linha analítica de 193,696 nm para o CRM TORT-2 utilizando SS-HR-CS-GF AAS a) sem correção b) com correção por LSBC utilizando NH₄H₂PO₄ como espectro de referência. Nos dois casos foi utilizado 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% Triton X-100. Tp 1200 °C, Ta 2400 °C.

Pode-se observar através das Figuras 22 e 23 que a correção pelo método dos mínimos quadrados utilizando NH₄H₂PO₄ como espectro de referência foi eficiente na correção das interferências espectrais existentes nessas amostras. A técnica de SS-HR-CS-GF AAS comprovou, conforme já relatado na literatura, que nesse tipo de matriz há presença de fosfatos. Porém, o que se observou é que a correção para a interferência de fosfato não foi suficiente para encontrar o valor certificado de As total presente nos CRMs, conforme será visto no item 5.3.2.

Apesar dessa constatação, foi decidido seguir com o estudo dos parâmetros instrumentais para a otimização do método desenvolvido. Na Figura 24 é apresentado o estudo da quantidade de massa de modificador necessária para estabilizar termicamente o As. Pode-se observar que para a amostra abrótea, o maior sinal analítico para uma quantidade máxima de amostra é obtido com uma massa de 15 μg de Pd e 9 μg de Mg. Com o padrão aquoso, o sinal analítico não apresentou uma variação significativa nos valores de absorvância integrada. Esses resultados são concordantes com os obtidos anteriormente por LS-GF AAS. Em vista disso, a massa de modificador utilizada nos estudos posteriores é de 15 μg de Pd e 9 μg de Mg. Também foi adicionado 0,06% (v/v) de Triton X-100 a esses dois compostos na mistura. O modificador químico foi pipetado sobre a amostra logo após as pesagens das mesmas.

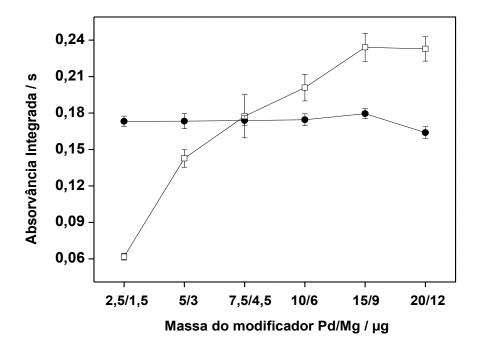


Figura 24. Otimização da massa de modificador Pd/Mg em 0,06% (v/v) de Triton X-100. (\square) absorvância integrada normalizada para 0,1 mg de amostra abrótea, (\bullet) 1 ng As em 10 μ L de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. Tp: 1200 °C, Ta: 2400 °C.

Foram utilizadas duas temperaturas de secagem com taxas de aquecimento relativamente lentas e tempos de espera longos (patamar) como mostra a Tabela V. Isso se fez necessário para que houvesse um aquecimento mais homogêneo. Além disso, foi utilizada uma etapa adicional denominada "ash". Nessa etapa temos a presença de um gás adicional que é o ar comprimido, ela foi utilizada para que a queima da amostra fosse mais eficiente e os resíduos de carbono que ficam na plataforma fossem reduzidos.

Foram estabelecidas curvas de pirólise para a amostra abrótea e para o padrão aquoso de As com o uso do modificador químico 15 µg de Pd + 9 µg de Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100. Essas curvas estão apresentadas na Figura 25. Os valores de absorvância integrada para a amostra abrótea foram normalizados para uma massa de 0,1 mg.

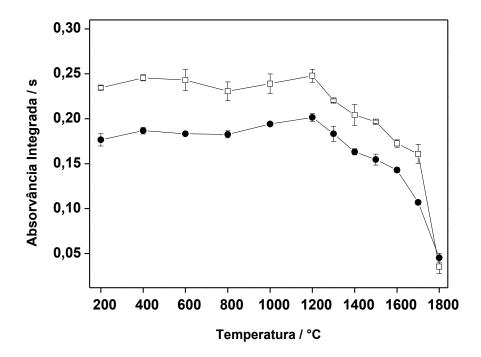


Figura 25. Curvas de pirólise para As; (□) normalizada para 0,1 mg de abrótea com 15 μg Pd + 9 μg Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, (•) 1 ng As em 10 μL de solução aquosa em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ Ta: 2400 °C.

Pode-se observar pela Figura 25 que a temperatura de pirólise ideal é de 1200°C para a amostra abrótea e para o padrão aquoso. Para a amostra abrótea não foi possível a leitura do sinal utilizando temperaturas de pirólise inferiores a 200 °C.

Para verificar a influência da massa de amostra pesada sobre a plataforma na linearidade de resposta do sinal analítico foram realizadas medidas variando-se a massa de amostra. O estudo foi realizado com a amostra abrótea liofilizada. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26.

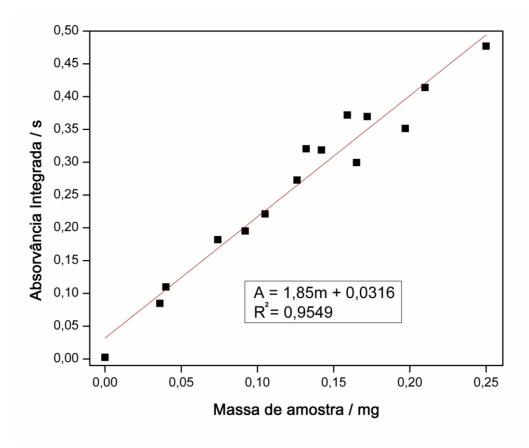


Figura 26. Influência da massa de amostra abrótea na linearidade de resposta utilizando 15 μ g Pd + 9 μ g Mg + 0,06% (v/v) Triton X-100 como modificador químico, Tp 1200 °C; Ta 2400 °C.

Pode-se verificar que para a amostra abrótea, a relação de massa com a absorvância integrada apresenta boa linearidade, ou seja, com o aumento da massa de amostra pesada sobre a plataforma existe um aumento linear de resposta do sinal analítico até 0,25 mg. Acima dessa massa o sinal de absorvância integrada mantém-se praticamente o mesmo. Estudo semelhante também foi realizado com as amostras M2 e M4. A amostra M2 apresentou boa linearidade com massas até 0,28 mg (R^2 = 0,9644) e a amostra M4 apresentou boa linearidade com massas até 0,30 mg (R^2 = 0,9513).

5.3.1. Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para determinação de As em amostras de pescado liofilizadas utilizando SS-HR-CS GF AAS estão expressos na Tabela XIX. Foram construídas curvas de

calibração utilizando soluções padrão aquosas na faixa de concentração de 15-200 μ g L⁻¹ (0,15-2,0 ng).

Os seguintes parâmetros de mérito foram determinados para a avaliação do método proposto: massa característica (m₀), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Os valores de LD e LQ foram calculados para a massa de 0,25 mg de amostra.

Tabela XIX. Parâmetros de mérito para a determinação de As por SS-HR-CS GF AAS.

Equação de regressão linear	\mathbb{R}^2	m ₀ / pg	LD ^a (n=10) / μg g ⁻¹	LQ ^a (n=10) / μg g ⁻¹
A = 0.00463 + 0.1954 m(ng)	0,9985	20	0,05	0,16

^a baseado na técnica "resposta de massa zero" e calculado para 0,25 mg de amostra.

A técnica de HR-CS GF AAS mostrou maior sensibilidade (LD e m_0) e maior linearidade quando comparada ao LS-GF AAS, mas ambos os LQ estão abaixo dos níveis máximos de As em pescado estabelecidos pela legislação⁴.

A precisão do método utilizando SS-HR-CS GF AAS para determinação de As em amostras de pescado liofilizadas foi calculada a partir de seis leituras consecutivas de quatro amostras reais, cinco materiais de referência certificados e um material de referência, e expressa como coeficiente de variação (CV). Os valores de CV estão reportados na Tabela XX e apresentaram uma variabilidade de 2 a 8%. Já a reprodutibilidade das amostras de pescado digeridas apresentou uma variação de 1% a 4%.

5.3.2. Resultados Analíticos

Na Tabela XX são apresentados os resultados da determinação de As em quatro amostras de pescado liofilizadas, cinco materiais de referência certificados e um material de referência utilizando SS-HR-CS GF AAS. Os valores obtidos com o método de digestão ácida assistida em micro-ondas também são mostrados na Tabela XX. Pode-se observar que a concentração obtida para os CRMs apresentou uma diferença significativa do valor certificado de aproximadamente 44% para o TORT-2, 50% para o DORM-3, 33% para o SRM 2976, 64% para o SRM 1566b, 43% para o DOLT-4 e 42% para o 9th PT. Isso pode estar ocorrendo porque, apesar da correção eficiente para a interferência espectral de fosfato, há algum tipo de

interferência química na determinação de As nessas amostras. Os valores obtidos com o método de digestão em micro-ondas para as amostras e os CRMs TORT-2 e DORM-3 não diferem significativamente dos resultados obtidos utilizando SS-HR-CS GF AAS a um nível de 95% de confiança conforme o teste *t*-student.

Tabela XX. Determinação de As em amostras de pescado liofilizadas por SS-HR-CS GF AAS. Os resultados estão expressos em μ g g⁻¹ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n = 3).

		Concentração de As (µg g ⁻¹)								
Amostras	Valor certificado (µg g ⁻¹)	SS-HR-CS GF AAS (n=6)	CV (%)	DIGESTÃO (n=3)	CV (%)					
TORT-2	$21,6 \pm 1,80$	$9,5 \pm 0,42$	4	$9,4 \pm 0,21$	2					
DORM-3	$6,88 \pm 0,30$	$3,5 \pm 0,19$	5	2.9 ± 0.03	1					
SRM 2976	$13,3 \pm 1,80$	$4,4 \pm 0,37$	5	-	-					
SRM 1566b	$7,65 \pm 0,65$	$4,9 \pm 0,33$	2	-	-					
DOLT-4	$9,66 \pm 0,62$	$4,2 \pm 0,33$	6	-	-					
9 th PT	$6,65 \pm 0,71^{a}$	$2,8 \pm 0,25$	8	-	-					
M1	-	$17,5 \pm 0,80$	4	$17,5\pm0,75$	4					
M2	-	$2,0 \pm 0,07$	3	$1,9 \pm 0,07$	4					
M3	-	$1,0\pm0,07$	7	$1,1 \pm 0,04$	3					
M4	-	13.8 ± 0.37	3	$15,0 \pm 0,54$	4					

^a Valor de referência

Pode-se observar que apesar de existir interferência espectral de fosfato (ver Figuras 20 e 21) na determinação de As em amostras de pescado e CRMs utilizando o SS-HR-CS GF AAS, o método desenvolvido utilizando SS-GF AAS com correção de fundo baseado no efeito Zeeman foi eficiente para corrigir essa interferência, o que está de acordo com a literatura ¹⁹⁰. Consequentemente as concentrações de As obtidas com o método desenvolvido para SS-GF AAS (Tabela XVII) e com o método desenvolvido para SS-HR-CS GF AAS (Tabela XX) não apresentaram diferenças significativas.

Em relação aos valores obtidos com o método de digestão ácida assistida em microondas uma possível explicação seria a decomposição incompleta da AB. Este comportamento foi encontrado na literatura por diversos autores^{151,153,154}, onde os mesmos encontraram valores abaixo do certificado utilizando diversos tipos de digestões. Narukawa et al. 151 desenvolveram métodos de digestões ácidas, incluindo micro-ondas e três diferentes métodos em sistemas abertos com os seguintes ácidos: 1) HNO₃-HClO₄-H₂SO₄; 2) HNO₃-HClO₄-HF e 3) HNO₃-HClO₄, A decomposição da AB foi monitorada através da técnica (HPLC-ICP OES). A decomposição total só foi atingida com a presença do HClO₄ com temperaturas acima de 320 °C. As concentrações de As total encontradas foram inferiores aos valores certificados por ICP OES quando as digestões não degradaram a AB. Slejkovec et al. 153 observaram o mesmo comportamento na determinação de As total por espectrometria de fluorescência atômica por geração de hidretos (FI-HG AFS), onde o mesmo observou que a decomposição da AB só foi eficiente utilizando ácido HNO₃-H₂SO₄-H₂O₂ em sistema aberto com temperatura de 300°C. Goessler et al. 154 conseguiram a completa degradação da AB apenas com a digestão assistida em micro-ondas utilizando HNO₃ e H₂O₂ a 300°C por 90 minutos, as digestões foram realizadas em tubos de quartzo para suportar a temperatura de 300 °C. Os autores observaram que as digestões realizadas em temperaturas inferiores a 300 °C e tempo inferior a 90 minutos não foram eficientes na degradação da AB. Também foi reportado pelo Programa Internacional de Avaliação de Medidas (IMEP, do inglês International Measurement Evaluation Programme)^{191,192} resultados interlaboratoriais para As total em frutos do mar, onde alguns laboratórios participantes, também encontraram dificuldades na determinação de As total nesse tipo de matriz utilizando GF AAS e HG AAS. Segundo os relatórios a causa desses resultados insatisfatórios foi a dificuldade em degradar a AB. 191,192

Além das interferências espectrais já observadas neste trabalho, que foram eficientemente corrigidas, há uma evidência de uma forte interferência das espécies químicas na determinação de As em pescados, o que pode apresentar uma influência significativa na determinação da concentração de As total utilizando a técnica de SS-GF AAS.

5.4. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO E ARSENOBETAÍNA EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADAS UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS

Apesar dos vários métodos propostos na literatura, os resultados encontrados neste trabalho utilizando as técnicas de SS-GF AAS e SS-HR-CS GF AAS foram inconclusivos na determinação de As total em amostras de pescado. Este fato indica a necessidade de uma cuidadosa pesquisa no desenvolvimento de novos métodos para a determinação de As total

neste tipo de amostra. Até o presente momento, não há publicações com o uso da determinação direta de As em amostras de pescado.

O objetivo do presente trabalho foi, em primeiro lugar, desenvolver um método analítico, baseado em SS-GF AAS, para a determinação de As em amostras de pescado *innatura*. No entanto, as concentrações dos CRMs não estão de acordo com seus valores certificados, e a investigação foi conduzida de modo a identificar as possíveis interferências durante as medições com AAS. A técnica de ICP-MS foi utilizada para determinar a concentração de As total nos CRMs e nas amostras de pescado utilizadas neste trabalho, para comparar os resultados obtidos com os encontrados por AAS. Já o HPLC-ICP-MS foi utilizado para identificar a concentração de AB, o que pode ser uma possível interferência química nas medições AAS.

5.4.1. Determinação de As em CRMs e em amostras de pescado liofilizadas utilizando ICP-MS

A técnica de ICP-MS é amplamente utilizada na determinação de As em amostras de pescado e frutos do mar¹²⁵. O método de preparo de amostra utilizado para as análises foi a digestão ácida assistida por micro-ondas descrita no item 4.5.2.1. Os resultados obtidos para a determinação de As em quatro amostras de pescado, cinco CRMs e um material de referência utilizando ICP-MS encontram-se resumidos na Tabela XXI. A precisão do método (CV) foi calculada a partir de três leituras consecutivas das amostras e CRMs, apresentando uma variabilidade de 1% a 5% (Tabela XXI). Os resultados obtidos para os CRMs estão de acordo com seus valores certificados.

Apesar das inúmeras tentativas de obter o valor certificado através das técnicas de AAS, o valor certificado encontrado não correspondeu ao esperado. Este fato sugere que algumas espécies químicas podem interferir durante as medições com AAS. A causa mais provável é a presença de AB, espécie química que apresenta elevada estabilidade e resistência à degradação, como mencionado anteriormente. Sendo assim, a análise de especiação foi realizada para determinar a quantidade de AB nas amostras e também nos CRMs.

5.4.2. Determinação da arsenobetaína em CRMs e em amostras de pescado liofilizadas utilizando HPLC-ICP-MS

A fim de identificar e quantificar a AB nas amostras de pescado e CRMs, um procedimento de extração e determinação dessa espécie química utilizando HPLC-ICP-MS foi investigado. O método de análise de especiação utilizado neste trabalho foi baseado em estudos de Llorente-Mirandes et al^{176,177}. Para avaliar a exatidão do método de análise de especiação empregado na determinação da AB, foi utilizado o CRM BCR-627, tecido de atum (valor certificado de AB: 3,90 ± 0,20 µg g⁻¹). Pode-se observar através da Tabela XXI que a concentração de AB obtida pelo método proposto neste trabalho está de acordo com seu valor certificado. Os resultados obtidos para a determinação da AB em CRMs e nas quatro amostras de pescado utilizando HPLC-ICP-MS encontram-se resumidos na Tabela XXI. A precisão foi calculada a partir de três medições consecutivas das amostras e CRMs apresentando uma variabilidade de 2% a 9% (Tabela XXI). Conforme reportado na literatura por diversos autores^{17,63,70,78,86} a AB é a principal espécie encontrada em amostras de pescado e frutos do mar. A Tabela XXI confirma essa afirmação através dos resultados dos CRMs e amostras analisadas neste trabalho, onde a AB foi encontrada em maior concentração, exceto para o SRM 1566b. A Figura 27 exibe os cromatogramas dos extratos dos CRMs BCR-627 e TORT-2, além da amostra M1, onde pode ser visto a espécie AB, espécie majoritária, utilizando HPLC-ICP-MS.

Um resultado interessante foi observado em todos os CRMs analisados neste trabalho. A concentração da AB obtida por HPLC-ICP-MS (Tabela XXII) adicionado a concentração de As total determinado pelas técnicas de AAS apresentam boa concordância com os valores certificados (Tabela XXII).

Foi aplicado os testes *t*-student em todos os CRMs comparando: (i) o valor certificado com o valor obtido da soma do SS-GF AAS + AB (HPLC-ICP-MS) e o (ii) valor obtido da soma do SS-HR-CS GF AAS + AB (HPLC-ICP-MS). Para os CRMs TORT-2, SRM 1566b, DOLT-4 e material de referência 9th PT foram concordantes a um nível de 95% conforme o teste *t*-student (i). Já para (ii) todos os CRMs da Tabela XXII foram concordantes a um nível de 95% conforme o teste *t*-student. Somente a amostra M3 apresentou concordância a um nível de 95% conforme o teste *t*-student com o valor obtido pela técnica de ICP-MS.

Tabela XXI. Determinação de As em amostras de pescado e CRMs utilizando a amostragem direta de sólidos (SS), GF AAS e ICP-MS. Determinação da AB utilizando HPLC-ICP-MS. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de As em massa seca (média ± desvio padrão, n = 3).

	Valor		Concentração de As (µg g ⁻¹	Concenti		As e AB^b por ICP-N $(g g^{-1})$	MS				
Amostras	certificado	SS-LS (n=6)	CV (%)	SS-HR CS (n=6)	CV (%)	Digestão (n=3)	CV (%)	Digestão (n=3)	CV (%)	Extração/HPLC (AB ^c)(n=3)	CV (%)
TORT-2	$21,6 \pm 1,80$	$9,4 \pm 0,67$	7	$9,5 \pm 0,42$	4	$9,4 \pm 0,21$	2	$22,4 \pm 1,10$	5	$13,1\pm0,45$	3
DORM-3	$6,88 \pm 0,30$	$3,4 \pm 0,23$	7	$3,5 \pm 0,19$	5	$2,9 \pm 0,03$	1	-	-	-	-
SRM 2976	$13,3 \pm 1,80$	$7,4\pm0,40$	5	$4,4 \pm 0,37$	5	-	-	$13,7\pm0,25$	2	$10,3 \pm 0,20$	2
SRM 1566b	$7,65 \pm 0,65$	$4,3 \pm 0,25$	2	$4,9 \pm 0,33$	2	-	-	$7,67 \pm 0,13$	2	$2,63 \pm 0,07$	3
DOLT-4	$9,66 \pm 0,62$	$4,1 \pm 0,10$	6	$4,2 \pm 0,33$	6	-	-	$9,64 \pm 0,11$	1	$5,17 \pm 0,51$	9
BCR-627 ^a	$4,80 \pm 0,30$	-	-	-	-	-	-	$4,84 \pm 0,13$	3	$3,80 \pm 0,07$	2
9 th PT	$6,65 \pm 0,71^{\mathbf{b}}$	$2,9 \pm 0,14$	5	$2,8 \pm 0,25$	8	-	-	$7,00 \pm 0,32$	4	$4,30 \pm 0,19$	4
M1	-	$17,2 \pm 0,60$	3	$17,5 \pm 0,80$	4	$17,5 \pm 0,75$	4	$35,2 \pm 1,14$	3	$33,5 \pm 2,95$	8
M2	-	$2,5 \pm 0,16$	6	$2,\!0\pm0,\!07$	3	$1,9\pm0,07$	4	$7,10\pm0,04$	1	$6,58 \pm 0,19$	3
M3	-	$1,2 \pm 0,09$	7	$1,0 \pm 0,07$	7	$1,1 \pm 0,04$	3	$4,20 \pm 0,11$	1	$3,20 \pm 0,20$	6
M4	-	$15,0 \pm 0,92$	6	13.8 ± 0.37	3	$15,0 \pm 0,54$	4	$35,0 \pm 0,16$	1	$33,2 \pm 2,71$	8

 $[^]a$ Valor Certificado para AB: 3,90 \pm 0,20 μg $g^{-1};~^b$ Valor de referência; c Concentração de AB.

Tabela XXII. Determinação de As em amostras de pescado e CRMs utilizando a amostragem direta de sólidos (SS) e GF AAS somadas com as concentrações da AB obtidas pelo HPLC-ICP-MS. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n = 3).

			Técnicas						
Amostras	Valor certificado	ICP-MS	SS-LS-GF AAS + AB	SS-HR-CS-GF AAS + AB	GF AAS + AB				
TORT-2	21,6 ± 1,80	22,4 ± 1,10	22,5 ± 1,12	$22,6 \pm 0,87$	$22,3 \pm 0,66$				
SRM 2976	$13,3 \pm 1,80$	$13,7 \pm 0,25$	$17,7 \pm 0,60$	$14,7\pm0,57$	-				
SRM 1566b	$7,65 \pm 0,65$	$7,67 \pm 0,13$	$6,93 \pm 0,32$	$7,53 \pm 0,40$	-				
DOLT-4	$9,66 \pm 0,62$	$9,64 \pm 0,11$	$9,27 \pm 0,61$	$9,37 \pm 0,84$	-				
9 th PT	$6,65 \pm 0,71^{a}$	$7,00 \pm 0,32$	$7,20 \pm 0,33$	$7,10\pm0,\!44$	-				
M1	-	$35,2 \pm 1,14$	$50,7 \pm 3,55$	$51,0 \pm 3,75$	$51,0 \pm 3,70$				
M2	-	$7,10 \pm 0,04$	$9,10 \pm 0,35$	$8,58 \pm 0,26$	$8,\!48 \pm 0,\!26$				
M3	-	$4,20 \pm 0,11$	$4,40 \pm 0,29$	$4,\!20\pm0,\!27$	$4,30 \pm 0,24$				
M4	<u>-</u>	$35,0 \pm 0,16$	$48,2 \pm 3,63$	47.0 ± 3.08	$48,2 \pm 3,25$				

^a Valor de referência.

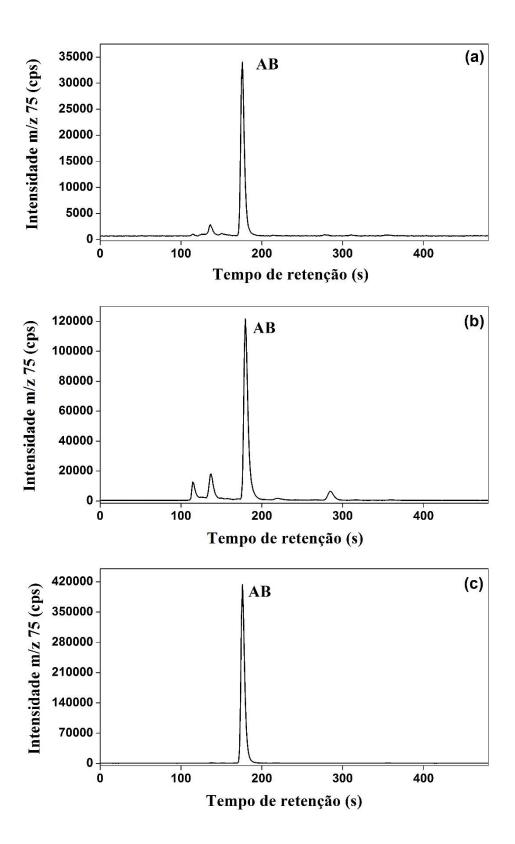


Figura 27. Cromatogramas dos extratos (a) BCR-627 (b) TORT-2 e da (c) amostra M1 por troca catiônica utilizando HPLC-ICP-MS.

5.5. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS.

5.5.1. Análise da concentração total de As em CRMs utilizando ICP-MS

Para avaliar a exatidão do procedimento aplicado na determinação de As total nas amostras de pescado e frutos do mar por ICP-MS foram utilizados sete CRMs (TORT-2, DOLT-4, SRM 2976, SRM 1566b, BCR-627, ERM-BC211e ERM-CE278) e um material de referência 9th PT. Os resultados das análises simultâneas dos CRMs listados acima estão descritos na Tabela XXIII. Para controle de qualidade do método aplicado, um CRM foi analisado a cada lote de amostras (1 lote = 3 diferentes amostras em triplicata). O valor da concentração total de As encontrado por ICP-MS, não difere significativamente do valor certificado a um nível de 95% de confiança segundo o teste t-student (Tabela XXIII). A precisão do método (CV) para determinação de As total foi calculada a partir de três leituras consecutivas dos CRMs. Os valores de CV foram: 4,9% para TORT-2, 1,14% para DOLT-4, 1,8% para SRM 2976, 1,7% para SRM 1566b, 2,6% para BCR-627, 4,1% para ERM-BC211, 3,4% para ERM-CE278 e 4,5% para o material de referência 9th PT. Os valores de CV estão de acordo com a literatura^{77,80,177,193}. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram calculados como três vezes (3σ) e dez vezes (10σ) o valor do desvio padrão das dez medidas do branco, respectivamente¹⁹³. Os resultados obtidos foram 0,006 µg As g⁻¹ para LD e 0,021 µg As g⁻¹ para LQ.

Tabela XXIII. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para As total e para As total dos extratos dos CRMs. As concentrações são expressas em $\mu g \ g^{-1}$ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n=3). Valores de eficiência de extração e recuperação da coluna.

CRMs	Valor Certificado	Total As	Total do Extrato As	Eficiênc. Ext. (%)	Recup. Coluna (%)
TORT-2	$21,6 \pm 1,8$	$22,4 \pm 1,1$	$21,9 \pm 1,7$	98	78
DOLT-4	$9,66 \pm 0,62$	$9,64 \pm 0,11$	$7,39 \pm 0,39$	77	84
ERM-CE278	$6,07 \pm 0,13$	$6,09 \pm 0,21$	$4,46 \pm 0,23$	73	75
NIST 1566	$7,65 \pm 0,65$	$7,67 \pm 0,13$	$6,85 \pm 0,19$	89	58
NIST 2976	$13,30 \pm 1,8$	$13,7 \pm 0,25$	$13,3 \pm 0,52$	97	86
9th PT	$6,65 \pm 0,71^{a}$	$7,00 \pm 0,32$	$6,89 \pm 0,06$	98	83
BCR-627	$4,80 \pm 0,3$	$4,84 \pm 0,13$	$4,75\pm0,08$	98	88
ERM-BC211	$0,260 \pm 0,013$	$0,263 \pm 0,011$	$0,265 \pm 0,010$	101	99

^a Valor de referência: média ± desvio-padrão;

5.5.2. Análise das espécies de As em CRMs utilizando HPLC-ICP-MS

5.5.2.1. Eficiência de extração

A eficiência de extração ¹⁷⁶ foi avaliada através da razão (entre a concentração total de As presente nos extratos pela concentração total de As, obtido pelo método da digestão ácida) dos CRMs e das amostras de pescado e frutos do mar. Os valores de eficiência de extração estão descritos na Tabela XXIII para os CRMs e Tabela XXIV para as amostras reais. Conforme pode ser observado pelas Tabelas XXIII e XXIV, os valores de eficiência de extração apresentaram uma variabilidade de 73% a 104%, com média de 89%, o que está de acordo com a literatura^{70,194}. Assim, a solução contendo 0,2% (v/v) de HNO₃ e 1% (v/v) de H₂O₂ provou ser um solvente eficaz para a extração das espécies de As em pescado e frutos do mar. Um recente estudo realizado por Pétursdóttir et al. 70 comparou nove diferentes métodos de extração para determinação de arsênio inorgânico nesse tipo de amostra, incluindo a mistura HNO₃ e H₂O₂. No trabalho de Pétursdóttir *et al.* 70 foi observado que a maior eficiência de extração para todas as amostras foi obtida utilizando HNO₃/H₂O₂ como método extrator, o que foi comprovado por este trabalho. Observando os valores de eficiência de extração das Tabelas XXIII e XXIV, uma média de 93% foi obtida para a maioria das amostras e CRMs, com exceção de (DOLT-4, ERM CE278 e salmão-2), para a qual a média foi de 75%. De acordo com Pétursdóttir et al. 77 e Amavo et al. 194 esta diferença na eficiência de extração pode ser atribuída a quantidade de lipídios presente nas amostras. O peixe salmão tem um elevado teor de lipídios e, possivelmente continha arsenolipídios que não puderam ser extraídos utilizando este método de extração. No caso do CRM DOLT-4, o valor de eficiência de extração encontrado neste trabalho (77%) é semelhante ao valor encontrado por Pétursdóttir et al. 70 (78%) que também utilizou a mistura HNO₃/H₂O₂ como método de extração. Por outro lado, todas as amostras de pescado brasileiro, atum, sardinha e peixe-espada apresentaram alta eficiência de extração, acima de 90%.

Tabela XXIV. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para As total das amostras e para As total dos extratos de pescado e frutos do mar. As concentrações são expressas em μg g^{-1} de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n=3). Valores de eficiência de extração e recuperação da coluna.

Amagtwag	Egnésies	Nome comercial	Owigons	Total As	Total do	Eficiênc.	Recup.
Amostras	Espécies	Nome comercial	Origem	Total As	Extrato As	Ext. (%)	Coluna (%)
Peixes							
	Urophycis cirrata	Abrótea-1	Brasil	$35,2 \pm 1,14$	$34,3 \pm 0.89$	97	98
	Pagrus pagrus	Pargo	Brasil	$35,0\pm0,16$	$33,8 \pm 1,84$	97	101
	Merluccius hubbsi	Merluza-1	Brasil	$7,10 \pm 0,04$	$6,70 \pm 0,16$	94	99
	Merluccius gayi	Merluza-2	Brasil	$4,20 \pm 0,11$	$3,80 \pm 0,03$	90	89
	Phycis blennoides	Abrótea-2	Espanha	$31,8 \pm 1,27$	$27,6 \pm 1,22$	86	89
	Sardina pilchardus	Sardinha	Espanha	$7{,}42 \pm 0{,}08$	$6,88 \pm 0,27$	93	87
	Salmo sp,	Salmão-1	Espanha	$1{,}70 \pm 0{,}09$	$1,45 \pm 0,04$	86	85
	Salmo sp,	Salmão-2	Espanha	$1,77 \pm 0,10$	$1,38 \pm 0,08$	76	70
	Thunnus sp,	Atum-1	Espanha	$1,44 \pm 0,09$	$1,41 \pm 0,09$	98	77
	Thunnus sp,	Atum-2	Espanha	$1,71 \pm 0,12$	$1,71 \pm 0,06$	94	86
	Luvarus imperialis	Peixe Sol	Espanha	$4,\!46\pm0,\!08$	$4,65 \pm 0.07$	104	93
	Xiphias gladius	Peixe Espada-1	Espanha	$5,10 \pm 0,08$	$5,20 \pm 0,08$	102	91

	Xiphias gladius Xiphias gladius	Peixe Espada-2 Peixe Espada-3	Espanha Espanha	$3,30 \pm 0,21$ $2,90 \pm 0,04$	$3,00 \pm 0,11$ $2,58 \pm 0,05$	93 90	104 84
Crustáceos							
	Aristeus antennatus	Camarão-1	Espanha	$2,3 \pm 0,07$	$2,0\pm0,07$	87	83
	Aristaeopsis edwardsiana	Camarão-2	Espanha	$3,1 \pm 0,08$	$2,9\pm0,05$	94	82
	Crangon crangon	Camarão-3	Espanha	$1,2 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,09$	83	70
Bivalves							
	Tapes pullastra	Marisco-1	Espanha	$17,0 \pm 1,40$	$16,8 \pm 0,94$	99	92
	Tapes Decussatus	Marisco-2	Espanha	$12,2\pm0,16$	$10,5 \pm 0,06$	86	97
	Mytilus edulis	Mexilhão	Espanha	$12,9 \pm 0,74$	$10,3 \pm 0,08$	80	97
	Cerastoderma edule	Berbigão	Espanha	$8,3 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,45$	90	73
	Ostrea sp,	Ostra	Espanha	$24,6 \pm 0,30$	$21,7\pm0,28$	88	79

5.5.2.2. Recuperação da coluna

A recuperação da coluna é expressa como a razão do As total, soma de todas as espécies de As eluídas a partir da coluna cromatográfica, pela concentração total de As presente nos extratos, injetados na mesma coluna cromatográfica¹⁷⁶. O cálculo de recuperação da coluna é indispensável para um controle na separação cromatográfica e também na avaliação da quantificação das espécies de As em qualquer tipo de amostra. Os valores de recuperação da coluna apresentaram uma variabilidade de 58% a 99% para os CRMs (Tabela XXIII) e 70% a 104% para todas as amostras (Tabela XXIV). Os valores apresentados neste trabalho estão de acordo com a literatura^{70,77,80,176}.

5.5.2.3. Testes de Recuperação

Uma vez que não há material de referência certificado para arsênio inorgânico em matrizes de pescado e frutos do mar, o método de especiação proposto foi validado através da recuperação dos analitos adicionados na amostra. Padrões de As(III) e As(V) foram adicionados nas amostras de pargo, atum-1, marisco-1, mexilhão e CRM TORT-2. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos depois de fortificadas com os padrões inorgânicos. A oxidação quantitativa do As(III) para As(V) ocorreu, uma vez que, apenas arsenato foi encontrado como arsênio inorgânico nas amostras fortificadas. Os valores de recuperação encontrados para as amostras pargo, atum-1, marisco-1, mexilhão e TORT-2 foram: 102 ± 2 , 100 ± 5 , 100 ± 4 , 101 ± 2 e 106 ± 2 (média% \pm desvio padrão, n = 3), respectivamente. Estes valores de recuperação foram calculados de acordo com a literatura 193 e demonstraram índices de recuperação satisfatórios para arsênio inorgânico. Nas Figuras 28 e 29 são exibidos os cromatogramas dos extratos das amostras marisco-1 e pargo, respectivamente. A amostra marisco-1 foi fortificada com 0,200 mg As kg-1 de As(III) e As(V); pargo com 0,250 mg As kg-1 de As(III) e As(V). Como pode ser visto (Figuras 28 e 29), o arsênio inorgânico foi satisfatoriamente recuperado como As(V) para essas duas amostras.

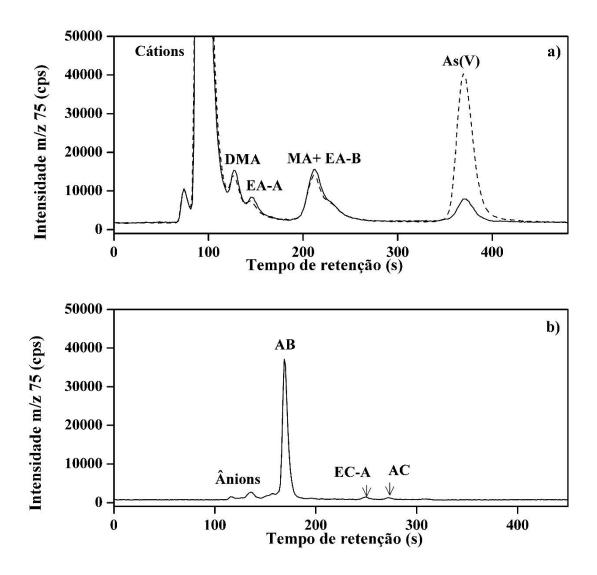


Figura 28. Cromatogramas dos extratos da amostra marisco-1 por troca aniônica (a) (linha contínua: amostra não fortificada e linha pontilhada: amostra fortificada com arsênio inorgânico) e (b) troca catiônica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS).

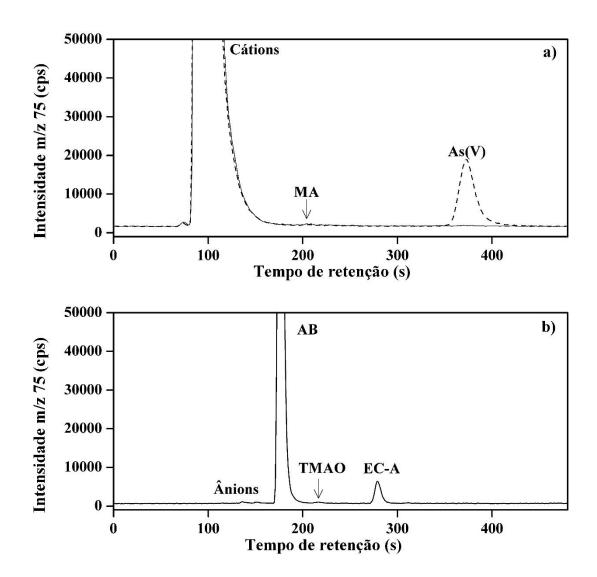


Figura 29. Cromatogramas dos extratos da amostra pargo por troca aniônica (a) (linha contínua: amostra não fortificada e linha pontilhada: amostra fortificada com arsênio inorgânico) e (b) troca catiônica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS).

5.5.2.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do procedimento de extração aplicado na determinação das espécies de As nas amostras de pescado e frutos do mar, foram utilizados dois CRMs: BCR-627 (Atum) e ERM-BC211 (Arroz). O CRM BCR-627 têm um valor certificado de 3,9 \pm 0,22 mg kg⁻¹ de As para AB e 0,15 \pm 0,02 mg kg⁻¹ de As para DMA. Com o objetivo de avaliar a exatidão dos resultados para arsênio inorgânico, foi utilizado o ERM-BC211 devido à falta de CRM para este tipo de analito em matrizes de pescado e frutos do mar. O ERM BC-211 têm um valor certificado de 0,124 \pm 0,011 mg kg⁻¹ de As inorgânico e 0,119 \pm 0,013 mg kg⁻¹ de As para DMA. Os valores encontrados para o ERM BC-211 e BCR-627 estão descritos na Tabela XXV e não diferiram significativamente dos valores certificados a um nível de 95% de confiança.

Zmozinski, A.V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela XXV. Resultados analíticos obtidos por HPLC-ICP-MS para as espécies de As em CRMs. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n = 3).

CRMs				Espéci	es de Arsênio					Soma Espécies
	DMA	MA	EA-B ^b	iAs	AB	TMAO	AC	EC-A ^c	EC-B ^d	
TORT-2	$1,57 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	0.71 ± 0.04	$13,1 \pm 0,45$	$0,19 \pm 0,02$	0.05 ± 0.004	$0,94 \pm 0,05$	0.08 ± 0.02	$17,0 \pm 0,64$
DOLT-4	$0,\!45\pm0,\!07$	$0,10\pm0,02$	$0,07 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,003$	$5,17 \pm 0,51$	$0,32 \pm 0,01$	<ld< th=""><th>$0,\!10\pm0,\!01$</th><th><ld< th=""><th>$6,24 \pm 0,63$</th></ld<></th></ld<>	$0,\!10\pm0,\!01$	<ld< th=""><th>$6,24 \pm 0,63$</th></ld<>	$6,24 \pm 0,63$
ERM-CE278	$0,62 \pm 0,04$	$0,\!10\pm0,\!02$	$0,03 \pm 0,007$	$0,07 \pm 0,003$	$2,\!27\pm0,\!17$	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,09 \pm 0,005$</th><th>$0,17 \pm 0,012$</th><th>$3,36 \pm 0,26$</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>$0,09 \pm 0,005$</th><th>$0,17 \pm 0,012$</th><th>$3,36 \pm 0,26$</th></ld<>	$0,09 \pm 0,005$	$0,17 \pm 0,012$	$3,36 \pm 0,26$
NIST 1566	$0,\!84\pm0,\!06$	<ld< th=""><th>$0,\!45\pm0,\!02$</th><th>$0,05 \pm 0,001$</th><th>$2,63 \pm 0,07$</th><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$3,97\pm0,15$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	$0,\!45\pm0,\!02$	$0,05 \pm 0,001$	$2,63 \pm 0,07$	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$3,97\pm0,15$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$3,97\pm0,15$</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>$3,97\pm0,15$</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>$3,97\pm0,15$</th></ld<>	$3,97\pm0,15$
NIST 2976	$0,\!41\pm0,\!05$	$0,12 \pm 0,002$	$0,30 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,013$	$10,3 \pm 0,20$	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,\!14\pm0,\!02$</th><th>$0,13 \pm 0,012$</th><th>$11,5 \pm 0,33$</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>$0,\!14\pm0,\!02$</th><th>$0,13 \pm 0,012$</th><th>$11,5 \pm 0,33$</th></ld<>	$0,\!14\pm0,\!02$	$0,13 \pm 0,012$	$11,5 \pm 0,33$
9th PT	$0,5 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,19$	$0,23 \pm 0,01$	<ld< th=""><th>$0,16 \pm 0,03$</th><th><ld< th=""><th>$5,73 \pm 0,36$</th></ld<></th></ld<>	$0,16 \pm 0,03$	<ld< th=""><th>$5,73 \pm 0,36$</th></ld<>	$5,73 \pm 0,36$
BCR-627	0.13 ± 0.02	0.02 ± 0.004	0.03 ± 0.006	$0,02 \pm 0,002$	$3,8 \pm 0,07$	<ld< th=""><th>$0,05 \pm 0,008$</th><th>$0,05 \pm 0,003$</th><th>$0,06 \pm 0,006$</th><th>$4,16 \pm 0,11$</th></ld<>	$0,05 \pm 0,008$	$0,05 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,006$	$4,16 \pm 0,11$
	$0,15 \pm 0,02^{a}$				$3,9\pm0,2^{\mathrm{a}}$					
ERM-BC211	$0,128 \pm 0,006$	$0,016 \pm 0,004$	<ld< th=""><th>$0,119 \pm 0,005$</th><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	$0,119 \pm 0,005$	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>$0,26 \pm 0,01$</th></ld<>	$0,26 \pm 0,01$
0.77.1	0,119 ± 0,013 a	1.~		$0,124 \pm 0,011$ a						

^a Valor certificado: média ± desvio-padrão;

^b Espécies aniônicas de As não identificadas (EA-B) com tempo de retenção de 251 s;

 $^{^{\}rm c}$ Espécies catiônicas de As não identificadas (EC-A) com tempo de retenção de 279 s;

^d Espécies catiônicas de As não identificadas (EC-B) com tempo de retenção de 360 s.

5.5.2.5. Parâmetros de Mérito

A determinação dos valores de LD e LQ foi baseado no trabalho de Llorente-Mirandes *et al.* ¹⁹³ e calculados para cada espécie de As. Para calcular LD e LQ, o desvio padrão da linha de base foi multiplicado por 3 ou 10 (LD e LQ respectivamente) e dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração em altura de pico. Os valores de LD e LQ das espécies de As analisadas utilizando HPLC-ICP-MS estão expressos na Tabela XXVI.

Tabela XXVI. Limites de detecção e quantificação das espécies de As utilizando HPLC-ICP-MS.

Espécies de As	LD (µg As g ⁻¹)	LQ (µg As g ⁻¹)
As(III)	0,0010	0,0033
DMA	0,0014	0,0047
MA	0,0017	0,0056
As(V)	0,0024	0,0080
AB	0,0010	0,0033
TMAO	0,0028	0,0093
AC	0,0018	0,0060

5.5.3. Comparação dos valores de arsênio inorgânico em CRMs

As concentrações de arsênio inorgânico para os CRMs TORT-2, DOLT-4, BCR-627 e SRM 1566b encontrados na literatura desde 2005 estão apresentados na Tabela I. Estas concentrações variam amplamente de acordo com os métodos de extração e detecção empregados. Como pode ser visto na Tabela I, as concentrações para arsênio inorgânico variaram de 0,09-1,233 μg g⁻¹ para TORT-2, 0,010-0,152 μg g⁻¹ para DOLT-4, 0,004-1,161 μg g⁻¹ para SRM 1566b e 0,015-0,192 μg g⁻¹ para BCR-627. Na literatura (período de 2005 a 2014) não foi encontrado nenhum trabalho que apresente as concentrações de arsênio inorgânico para NIST SRM 2976, ERM-CE278 e para o material de referência 9th PT, materiais estes, que foram utilizados neste trabalho, cuja as concentrações para iAs estão descritos na Tabela XXV.

O IMEP e o EU-RL-HM realizaram dois testes de proficiência no ano de 2010 para quantificar arsênio inorgânico, metilmercúrio e outros metais traço em amostras de pescado e frutos do mar. Foi utilizado o CRM DOLT-4 (material teste), e os resultados encontrados pelos laboratórios especializados, utilizando diferentes técnicas e métodos de extração, ⁷¹ apresentaram uma variabilidade de 0,040 a 0,152 μg g⁻¹ para iAs (Tabela I). Pode-se observar que há uma forte discrepância entre os resultados apresentados. Baer *et al.* ⁷¹ concluíram que não foi possível estabelecer um valor certificado para arsênio inorgânico devido à dificuldade de análise nesse tipo de matriz. Devido a estes problemas, Pétursdóttir *et al.* ^{70,76,77} têm publicado diversos trabalhos a respeito da determinação de arsênio inorgânico em CRMs utilizando diferentes métodos de extração. Em seu mais recente trabalho Pétursdóttir *et al.* ⁷⁰ utilizaram nove diferentes métodos de extração na determinação de iAs em DOLT-4 e TORT-2. As concentrações variaram entre 0,010–0,036 μg g⁻¹ e 0,315–0,823 μg g⁻¹ para DOLT-4 e TORT-2, respectivamente (Tabela I). Este fato sugere que o tipo de solvente utilizado influi diretamente na extração de iAs neste tipo de matriz e a dificuldade em obter um valor de referência para iAs nos CRMs DOLT-4 e TORT-2.

As concentrações de iAs encontradas neste trabalho para DOLT-4 $(0,020 \pm 0,003 \, \mu g \, g^{-1})$ e TORT-2 $(0,710 \pm 0,040 \, \mu g \, g^{-1})$ estão concordantes com os valores encontrados por Pétursdóttir *et al.*⁷⁰ $(0,017 \pm 0,003 \, \mu g \, g^{-1} \, e \, 0,714 \pm 0,092 \, \mu g \, g^{-1}$ para DOLT-4 e TORT-2, respectivamente), os quais utilizaram um método de extração similar ao deste trabalho (extração assistida em micro-ondas com uma mistura de 2% HNO₃/3% H₂O₂). Por outro lado, Leufroy *et al.*⁶⁸ utilizando dois métodos de extração em micro-ondas (água e metanol/água) encontrou um valor médio de concentração de 1,183 $\mu g \, g^{-1}$ de iAs para o CRM TORT-2. Como pode ser observado, um valor superior, em comparação aos valores de iAs utilizando (HNO₃/H₂O₂), pelos autores citados anteriormente.

Em relação ao CRM BCR-627, a concentração encontrada neste estudo foi de 0,02 ± 0,002 μg g⁻¹ de iAs. Leufroy *et al.*⁶⁸ encontraram 0,074 ± 0,014 μg g⁻¹ de iAs utilizando apenas água como método de extração e 0,192 ± 0,071 μg g⁻¹ de iAs com a mistura metanol/água. Já Santos *et al.*⁷⁴ utilizando também a mistura metanol/água em micro-ondas, encontrou 0,325 μg g⁻¹ de iAs. Sloth *et al.*⁸⁶ utilizando um método de extração alcalina (micro-ondas e uma mistura de etanol/NaOH) encontrou uma concentração de 0,015 μg g⁻¹ de iAs. Pode-se observar que neste último estudo foi encontrado um valor de concentração similar ao deste trabalho (0,02 ± 0,002 μg g⁻¹ iAs) para o CRM BCR-627, apesar da diferença do método de extração.

No que diz respeito ao SRM 1566b, a concentração encontrada neste trabalho foi de $0.05 \pm 0.001~\mu g~g^{-1}$ de iAs, diferentemente dos valores reportados por Santos *et al.*⁷⁴ (1,161 $\mu g~g^{-1}$ de iAs) e Sloth *et al.*⁸⁶ (0,004 $\mu g~g^{-1}$ de iAs).

Em resumo, as concentrações de arsênio inorgânico encontradas neste trabalho utilizando os CRMs citados anteriormente (Tabela XXV) estão dentro da faixa de concentração descritos por diversos autores (Tabela I). Isto evidencia que o método de extração proposto por este trabalho apresentou resultados comparáveis. A ampla variabilidade das concentrações de iAs nestes CRMs demonstrou a dificuldade de se obter um valor exato deste analito para este tipo de matriz. A falta de materiais de referência certificados para arsênio inorgânico em matrizes de pescado e frutos do mar limita a comparação e validação das concentrações encontradas por diversos autores da literatura. O desenvolvimento de CRMs para este tipo de matriz ajudaria na validação de dados de especiação e na criação de uma diretriz que poderia estabelecer a quantidade máxima de iAs em pescados e frutos do mar⁷⁷.

5.5.4. Análise da concentração total de As em amostras de pescado e frutos do mar utilizando ICP-MS

Foi determinada a concentração de As total em 22 amostras, quatro amostras de pescado do Brasil e as outras restantes, da Espanha. As amostras foram classificadas em peixes (n=14), crustáceos (n=3) e bivalves (n=5). As concentrações foram quantificadas utilizando ICP-MS e estão descritas na Tabela XXIV. As concentrações de As total variaram de 1,2 a 35,2 μ g g⁻¹. Crustáceos e bivalves apresentaram mais As total em relação as amostras de pescado (com exceção de duas amostras de pescado brasileiro, abrótea-1 e pargo, e a amostra abrótea-2 da Espanha). Uma média de 10,2 μ g g⁻¹ em massa seca de As total foi encontrada em crustáceos e bivalves, enquanto que para pescado uma média de 3,73 μ g g⁻¹ de As total. Estes resultados estão de acordo com a literatura^{68,73,83,195,196}. Em 2004 o relatório da Corporação Científica da Europa (EU SCOOP) ¹⁹⁷ e Sirot *et al.*¹⁹⁶ destacaram a importância dos fatores geográficos, sazonais e ambientais como responsáveis pela ampla variação dos níveis de As em pescados e frutos do mar. Duas amostras de pescado brasileiro (abrótea-1 e pargo) e uma amostra de pescado da Espanha (abrótea-2) apresentaram altos níveis de As total: 35,2 \pm 1,14 μ g g⁻¹, 35,0 \pm 0,16 μ g g⁻¹ e 31,8 \pm 1,27 μ g g⁻¹, respectivamente. Os níveis para As total encontrados neste trabalho para as amostras de ostra e mexilhão foram: 24,6 \pm 0,30 μ g g⁻¹ e 12,9 \pm 0,74 μ g g⁻¹,

respectivamente. Leufroy *et al.* ⁶⁸ também reportaram valores de As total em amostras de ostras e mexilhão (média de 20,4 µg g⁻¹ de As para 5 diferentes tipos de ostras e média de 11,3 µg g⁻¹ para 10 diferentes tipos de mexilhão). Pode-se observar, que os valores de As total encontrados por Leufroy *et al.* ⁶⁸ nestas amostras são similares aos valores encontrados no presente estudo.

O governo brasileiro, através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, instituiu um valor de referência de 1 µg g⁻¹ de As total em amostras de pescado e frutos do mar⁴. Os valores encontrados neste trabalho estão acima dos valores recomendados pelo governo brasileiro. Embora as amostras apresentem altos níveis de As total, a espécie dominante é a AB, (cerca de 66% para frutos do mar, e 95% para os peixes, Tabela XXVII), considerada nãotóxico. Estes dados demonstram a necessidade de realizar a especiação em amostras de pescado e frutos do mar para discernir as espécies tóxicas e não-tóxicas. Da mesma forma, a necessidade de introduzir níveis máximos de arsênio inorgânico neste tipo de amostra nas legislações brasileira e europeia devem ser consideradas para futuras diretrizes.

5.5. Análise das espécies de As em amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-ICP-MS

Foi determinada as concentrações das espécies de As utilizando HPLC-ICP-MS nas 22 amostras, as quais inclui crustáceos, bivalves e pescado. Os resultados são apresentados na Tabela XXVII. Neste trabalho a AB foi encontrada como espécie majoritária em todas as amostras analisadas, concordando com a literatura^{68,196}. A espécie DMA foi encontrada como espécie minoritária nas amostras de mexilhão, mariscos e camarões, concordando com os autores Leufroy *et al.*⁶⁸, Cao *et al.*⁸¹, Cava-Montesinos *et al.*⁸⁴, Moreda-Piñeiro *et al.*⁷³ e Sirot *et al.*¹⁹⁶ que também encontraram DMA como espécie minoritária nas amostras citadas anteriormente. Pode-se observar através da Tabela XXVII que DMA foi encontrado em 73% das amostras analisadas e a espécie MA apenas em 36% (camarão, berbigão, ostra, pargo, abrótea e merluza). Em relação as amostras de pescado a espécie DMA foi encontrada em níveis mais elevados do que a espécie MA, o que também foi encontrado pelos autores Cava-Montesinos *et al.*⁸⁴, Leufroy *et al.*⁶⁸ e Sirot *et al.*¹⁹⁶. A respeito das espécies TMAO e AC foram encontradas em 50% e 18% de todas as 22 amostras analisadas, respectivamente.

Uma espécie desconhecida (EC-A), com tempo de retenção de 279s (Figura 26b), foi encontrada usando a coluna catiônica. Essa espécie apresentou uma variabilidade de 0,6% a

27% do arsênio total presente nas amostras (Tabela XXVII). Também foi encontrado um segundo composto desconhecido (EC-B), com tempo de retenção de 360s, que apresentou uma variabilidade de 0,3% a 6% do arsênio total presente nas amostras (Tabela XXVII). Estas espécies desconhecidas de cátions poderiam ser atribuídas a trimetilarsônicopropionato (TMAP) e íon tetrametilarsônico (TETRA), respectivamente, de acordo com Kirby *et al*¹⁹⁸. No entanto, não foi possível verificar essa atribuição, devido à falta de padrões adequados.

Em termos de espécies aniônicas, dois compostos desconhecidos, EA-A e EA-B, com tempos de retenção de 148s e 251s, respectivamente, foram encontrados como espécies minoritárias nas amostras de crustáceos e bivalves (Figura 28a). Em relação a espécie EA-A, pode- se observar pela Tabela XXVII que a mesma foi encontrada nas amostras de marisco-1 e mexilhão. A primeira possui 1,0% do arsênio total e a amostra de mexilhão 0,3% do arsênio total. Já a espécie EA-B apresentou uma variabilidade de 0,2% a 15% do arsênio total presente nas amostras. Estas espécies desconhecidas de ânions poderiam ser atribuídas a arseno-açúcares, como o dimetilarsínico-açúcar-glicol e dimetilarsínico-açúcar-fosfato, as quais foram identificadas em amostras de pescado e frutos do mar por Nischwitz et al⁸⁵. Devido à falta de padrões adequados, não foi possível verificar esta atribuição.

Devido a toxicidade do arsênio inorgânico, a discussão segue com enfoque nesta espécie em particular. O arsênio inorgânico foi extraído, identificado e quantificado como As(V), e separado seletivamente das outras espécies de As. Observando a Tabela XXVII, o arsênio inorgânico foi encontrado em 36% de todas as amostras analisadas neste trabalho. Não foi detectado arsênio inorgânico em nenhuma amostra de pescado (n = 14). Como exemplo, a Figura 29a exibe com clareza que o iAs não foi detectado no extrato da amostra de pargo (linha contínua). Nela pode-se observar também, que todo iAs foi recuperado com sucesso como As(V) (linha pontilhada). Portanto, o método de extração não converteu as outras espécies orgânicas de As em iAs. A Figura 29b mostra que a espécie majoritária no extrato de pargo é a AB, espécie majoritária encontrada nas 22 amostras analisadas neste trabalho (Tabela XXVII). A espécie de As inorgânico foi encontrada somente em bivalves e crustáceos com concentrações de até 0,35 µg g ⁻¹ (Tabela XXVII). Além disso, essa espécie representa menos de 3,3% do arsênio total presente nas amostras e suas concentrações estão abaixo dos limites permitidos pela legislação da Austrália/Nova Zelândia¹¹⁸ (2 µg g⁻¹ de iAs para pescado e crustáceos) e também da China¹¹⁹ (0,5 µg g⁻¹ de As inorgânico para todo pescado de importação e exportação, com exceção do peixe de cultivo, que o nível máximo permitido é de 0,1 μg g⁻¹). Pode ser visto através da Tabela XXVII que as maiores concentrações de iAs foi encontrada nas amostras de mariscos $(0.35 \pm 0.009 \ \mu g \ g^{-1} \ e \ 0.20 \pm 0.005 \ \mu g \ g^{-1})$ e berbigão $(0.27 \pm 0.008 \ \mu g \ g^{-1})$. Já as menores concentrações de iAs foram encontradas nas amostras de camarão (média de $0.043 \pm 0.004 \ \mu g \ g^{-1}$). Outros autores da literatura 68,80,83,86,196 também encontraram maiores concentrações de iAs em amostras de mariscos e menores concentrações em amostras de camarão.

Através do método de extração proposto neste trabalho foi constatado que há arsênio inorgânico apenas nas amostras de crustáceos e bivalves. Destaca-se também que a especiação de As neste tipo de matriz pode ser realizada de forma confiável para uma avaliação exata dos alimentos marinhos e segurança para os consumidores. Apesar da falta de legislação brasileira e europeia que regulamenta os níveis máximos de iAs em pescado e frutos do mar, os resultados apresentados neste trabalho têm contribuído para um aumento na disponibilidade de resultados confiáveis de iAs neste tipo de amostra, podendo ser aplicado em futuras diretrizes e em outros produtos alimentares. Consequentemente, o presente método pode ser uma ferramenta valiosa para os laboratórios de controle de alimentos que avaliam arsênio inorgânico em amostras de pescado e frutos do mar.

Tabela XXVII. Resultados analíticos obtidos HPLC-ICP-MS para as espécies de As em amostras de pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em $\mu g \ g^{-1}$ de As em massa seca (média \pm desvio padrão, n=3).

Espécies de Arsênio											Soma
Amostra	DMA	MA	EA-A ^a	EA-B ^b iAs		AB	TMAO	AC	EC-A ^c	EC-B ^d	Espécies
Peixes											
Abrótea	<ld< td=""><td>$0,014 \pm 0,001$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,5 \pm 2,95$</td><td>0.04 ± 0.005</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,014 \pm 0,001$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,5 \pm 2,95$</td><td>0.04 ± 0.005</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,5 \pm 2,95$</td><td>0.04 ± 0.005</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$33,5 \pm 2,95$</td><td>0.04 ± 0.005</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$33,5 \pm 2,95$	0.04 ± 0.005	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>0.1 ± 0.004</td><td>$33,6 \pm 2,96$</td></ld<>	0.1 ± 0.004	$33,6 \pm 2,96$
Pargo	<ld< td=""><td>$0,010 \pm 0,001$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,2 \pm 2,71$</td><td>0.04 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,94 \pm 0,062$</td><td><ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,010 \pm 0,001$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,2 \pm 2,71$</td><td>0.04 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,94 \pm 0,062$</td><td><ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$33,2 \pm 2,71$</td><td>0.04 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,94 \pm 0,062$</td><td><ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$33,2 \pm 2,71$</td><td>0.04 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,94 \pm 0,062$</td><td><ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$33,2 \pm 2,71$	0.04 ± 0.004	<ld< td=""><td>$0,94 \pm 0,062$</td><td><ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<></td></ld<>	$0,94 \pm 0,062$	<ld< td=""><td>$34,1 \pm 2,77$</td></ld<>	$34,1 \pm 2,77$
Merluza-1	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,58 \pm 0,19$</td><td>0.03 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,58 \pm 0,19$</td><td>0.03 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,58 \pm 0,19$</td><td>0.03 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,58 \pm 0,19$</td><td>0.03 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$6,58 \pm 0,19$</td><td>0.03 ± 0.004</td><td><ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$6,58 \pm 0,19$	0.03 ± 0.004	<ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<></td></ld<>	$0,04 \pm 0,002$	<ld< td=""><td>$6,65 \pm 0,39$</td></ld<>	$6,65 \pm 0,39$
Merluza-2	$0,13 \pm 0,02$	$0,012 \pm 0,001$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,2 \pm 0,20$</td><td><ld< td=""><td>$0,07 \pm 0,026$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,2 \pm 0,20$</td><td><ld< td=""><td>$0,07 \pm 0,026$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$3,2 \pm 0,20$</td><td><ld< td=""><td>$0,07 \pm 0,026$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$3,2 \pm 0,20$	<ld< td=""><td>$0,07 \pm 0,026$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,07 \pm 0,026$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$3,41 \pm 0,25$</td></ld<>	$3,41 \pm 0,25$
Abrótea-2	$0,24 \pm 0,02$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$20,3 \pm 1,12$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$20,3 \pm 1,12$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$20,3 \pm 1,12$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$20,3 \pm 1,12$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$20,3 \pm 1,12$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$4,53 \pm 0,29$</td><td><ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<></td></ld<>	$4,53 \pm 0,29$	<ld< td=""><td>$25,0 \pm 1,43$</td></ld<>	$25,0 \pm 1,43$
Sardinha	$0,16 \pm 0,015$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$5,27 \pm 0,13$</td><td>0.07 ± 0.003</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$5,27 \pm 0,13$</td><td>0.07 ± 0.003</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$5,27 \pm 0,13$</td><td>0.07 ± 0.003</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$5,27 \pm 0,13$</td><td>0.07 ± 0.003</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$5,27 \pm 0,13$	0.07 ± 0.003	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$6,0 \pm 0,14$</td></ld<>	$6,0 \pm 0,14$
Salmão-1	$0,012 \pm 0,0010$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,18 \pm 0,04$</td><td>$0,024 \pm 0,015$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,18 \pm 0,04$</td><td>$0,024 \pm 0,015$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,18 \pm 0,04$</td><td>$0,024 \pm 0,015$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,18 \pm 0,04$</td><td>$0,024 \pm 0,015$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$1,18 \pm 0,04$	$0,024 \pm 0,015$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,21 \pm 0,056$</td></ld<>	$1,21 \pm 0,056$
Salmão-2	0.03 ± 0.006	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,86 \pm 0,08$</td><td>0.03 ± 0.007</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,86 \pm 0,08$</td><td>0.03 ± 0.007</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,86 \pm 0,08$</td><td>0.03 ± 0.007</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,86 \pm 0,08$</td><td>0.03 ± 0.007</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,86 \pm 0,08$	0.03 ± 0.007	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>0.93 ± 0.009</td></ld<>	0.93 ± 0.009
Atum-1	$0,05 \pm 0,008$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,90 \pm 0,037$</td><td>$0,08 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$0,05 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,90 \pm 0,037$</td><td>$0,08 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$0,05 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,90 \pm 0,037$</td><td>$0,08 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$0,05 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,90 \pm 0,037$</td><td>$0,08 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$0,05 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,90 \pm 0,037$	$0,08 \pm 0,002$	<ld< td=""><td>$0,05 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<></td></ld<>	$0,05 \pm 0,007$	<ld< td=""><td>$1,08 \pm 0,054$</td></ld<>	$1,08 \pm 0,054$
Atum-2	$0,02 \pm 0,006$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,43 \pm 0,09$</td><td>$0,01 \pm 0,009$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,43 \pm 0,09$</td><td>$0,01 \pm 0,009$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,43 \pm 0,09$</td><td>$0,01 \pm 0,009$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,43 \pm 0,09$</td><td>$0,01 \pm 0,009$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$1,43 \pm 0,09$	$0,01 \pm 0,009$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,46 \pm 0,10$</td></ld<>	$1,46 \pm 0,10$
Peixe Sol	$0,04\pm0,008$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,15\pm0,31$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,15\pm0,31$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,15\pm0,31$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$4,15\pm0,31$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$4,15\pm0,31$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,09 \pm 0,007$</td><td><ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<></td></ld<>	$0,09 \pm 0,007$	<ld< td=""><td>$4,3\pm0,32$</td></ld<>	$4,3\pm0,32$
eixe Espada-1	$0,\!16\pm0,\!008$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,\!20\pm0,\!16$</td><td>$0,008 \pm 0,006$</td><td>$0,02 \pm 0,005$</td><td>$0,\!35\pm0,\!05$</td><td><ld< td=""><td>$4,73 \pm 0,22$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,\!20\pm0,\!16$</td><td>$0,008 \pm 0,006$</td><td>$0,02 \pm 0,005$</td><td>$0,\!35\pm0,\!05$</td><td><ld< td=""><td>$4,73 \pm 0,22$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$4,\!20\pm0,\!16$</td><td>$0,008 \pm 0,006$</td><td>$0,02 \pm 0,005$</td><td>$0,\!35\pm0,\!05$</td><td><ld< td=""><td>$4,73 \pm 0,22$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$4,\!20\pm0,\!16$</td><td>$0,008 \pm 0,006$</td><td>$0,02 \pm 0,005$</td><td>$0,\!35\pm0,\!05$</td><td><ld< td=""><td>$4,73 \pm 0,22$</td></ld<></td></ld<>	$4,\!20\pm0,\!16$	$0,008 \pm 0,006$	$0,02 \pm 0,005$	$0,\!35\pm0,\!05$	<ld< td=""><td>$4,73 \pm 0,22$</td></ld<>	$4,73 \pm 0,22$

Zmozinski, A.V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO
-----------------	------------------------

Peixe Espada-2	$0,05 \pm 0,009$	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$1,73 \pm 0,02$</th><th>$0,01 \pm 0,002$</th><th><ld< th=""><th>0.89 ± 0.02</th><th><ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>$1,73 \pm 0,02$</th><th>$0,01 \pm 0,002$</th><th><ld< th=""><th>0.89 ± 0.02</th><th><ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>$1,73 \pm 0,02$</th><th>$0,01 \pm 0,002$</th><th><ld< th=""><th>0.89 ± 0.02</th><th><ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>$1,73 \pm 0,02$</th><th>$0,01 \pm 0,002$</th><th><ld< th=""><th>0.89 ± 0.02</th><th><ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	$1,73 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,002$	<ld< th=""><th>0.89 ± 0.02</th><th><ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<></th></ld<>	0.89 ± 0.02	<ld< th=""><th>$2,68 \pm 0,05$</th></ld<>	$2,68 \pm 0,05$
Peixe Espada-3	$0,05 \pm 0,007$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,96 \pm 0,05$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,96 \pm 0,05$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,96 \pm 0,05$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,96 \pm 0,05$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$1,96 \pm 0,05$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,04$</td><td><ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<></td></ld<>	$0,16 \pm 0,04$	<ld< td=""><td>$2,17 \pm 0,09$</td></ld<>	$2,17 \pm 0,09$
Crustáceos											
Camarão-1	$0,060 \pm 0,008$	0.08 ± 0.009	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,060 \pm 0,008$</td><td>$1,44 \pm 0,023$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,01 \pm 0,004$</td><td><ld< td=""><td>$1,\!66\pm0,\!12$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,060 \pm 0,008$</td><td>$1,44 \pm 0,023$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,01 \pm 0,004$</td><td><ld< td=""><td>$1,\!66\pm0,\!12$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,060 \pm 0,008$	$1,44 \pm 0,023$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,01 \pm 0,004$</td><td><ld< td=""><td>$1,\!66\pm0,\!12$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,01 \pm 0,004$</td><td><ld< td=""><td>$1,\!66\pm0,\!12$</td></ld<></td></ld<>	$0,01 \pm 0,004$	<ld< td=""><td>$1,\!66\pm0,\!12$</td></ld<>	$1,\!66\pm0,\!12$
Camarão-2	<ld< td=""><td>$0,012 \pm 0,002$</td><td><ld< td=""><td>$0,007 \pm 0,001$</td><td>$0,037 \pm 0,002$</td><td>$2,21 \pm 0,039$</td><td><ld< td=""><td>$0,016 \pm 0,003$</td><td>$0,054 \pm 0,002$</td><td>$0,040 \pm 0,001$</td><td>$2,37 \pm 0,050$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,012 \pm 0,002$	<ld< td=""><td>$0,007 \pm 0,001$</td><td>$0,037 \pm 0,002$</td><td>$2,21 \pm 0,039$</td><td><ld< td=""><td>$0,016 \pm 0,003$</td><td>$0,054 \pm 0,002$</td><td>$0,040 \pm 0,001$</td><td>$2,37 \pm 0,050$</td></ld<></td></ld<>	$0,007 \pm 0,001$	$0,037 \pm 0,002$	$2,21 \pm 0,039$	<ld< td=""><td>$0,016 \pm 0,003$</td><td>$0,054 \pm 0,002$</td><td>$0,040 \pm 0,001$</td><td>$2,37 \pm 0,050$</td></ld<>	$0,016 \pm 0,003$	$0,054 \pm 0,002$	$0,040 \pm 0,001$	$2,37 \pm 0,050$
Camarão-3	<ld< td=""><td>$0,016 \pm 0,001$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,033 \pm 0,003$</td><td>$0,61 \pm 0,017$</td><td><ld< td=""><td>$0,005 \pm 0,001$</td><td>$0,020 \pm 0,002$</td><td>$0,016 \pm 0,002$</td><td>$0,70 \pm 0,024$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,016 \pm 0,001$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,033 \pm 0,003$</td><td>$0,61 \pm 0,017$</td><td><ld< td=""><td>$0,005 \pm 0,001$</td><td>$0,020 \pm 0,002$</td><td>$0,016 \pm 0,002$</td><td>$0,70 \pm 0,024$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,033 \pm 0,003$</td><td>$0,61 \pm 0,017$</td><td><ld< td=""><td>$0,005 \pm 0,001$</td><td>$0,020 \pm 0,002$</td><td>$0,016 \pm 0,002$</td><td>$0,70 \pm 0,024$</td></ld<></td></ld<>	$0,033 \pm 0,003$	$0,61 \pm 0,017$	<ld< td=""><td>$0,005 \pm 0,001$</td><td>$0,020 \pm 0,002$</td><td>$0,016 \pm 0,002$</td><td>$0,70 \pm 0,024$</td></ld<>	$0,005 \pm 0,001$	$0,020 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,002$	$0,70 \pm 0,024$
Bivalves											
Marisco-1	$0,25 \pm 0,006$	<ld< td=""><td>$0,18 \pm 0,02$</td><td>$2,07 \pm 0,08$</td><td>$0,35 \pm 0,009$</td><td>$11,7 \pm 0,73$</td><td><ld< td=""><td>$0,29\pm0,03$</td><td>$0,33 \pm 0,06$</td><td><ld< td=""><td>$15,4 \pm 0,91$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,18 \pm 0,02$	$2,07 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,009$	$11,7 \pm 0,73$	<ld< td=""><td>$0,29\pm0,03$</td><td>$0,33 \pm 0,06$</td><td><ld< td=""><td>$15,4 \pm 0,91$</td></ld<></td></ld<>	$0,29\pm0,03$	$0,33 \pm 0,06$	<ld< td=""><td>$15,4 \pm 0,91$</td></ld<>	$15,4 \pm 0,91$
Marisco-2	$0,14\pm0,02$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$1,\!86\pm0,\!44$</td><td>$0,20 \pm 0,005$</td><td>$7,93 \pm 0,27$</td><td><ld< td=""><td>$0,02 \pm 0,009$</td><td>$0,04 \pm 0,006$</td><td>$0,03 \pm 0,004$</td><td>$10,21 \pm 0,13$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$1,\!86\pm0,\!44$</td><td>$0,20 \pm 0,005$</td><td>$7,93 \pm 0,27$</td><td><ld< td=""><td>$0,02 \pm 0,009$</td><td>$0,04 \pm 0,006$</td><td>$0,03 \pm 0,004$</td><td>$10,21 \pm 0,13$</td></ld<></td></ld<>	$1,\!86\pm0,\!44$	$0,20 \pm 0,005$	$7,93 \pm 0,27$	<ld< td=""><td>$0,02 \pm 0,009$</td><td>$0,04 \pm 0,006$</td><td>$0,03 \pm 0,004$</td><td>$10,21 \pm 0,13$</td></ld<>	$0,02 \pm 0,009$	$0,04 \pm 0,006$	$0,03 \pm 0,004$	$10,21 \pm 0,13$
Mexilhão	$0,07 \pm 0,007$	<ld< td=""><td>$0,04 \pm 0,005$</td><td>$0,65 \pm 0,10$</td><td>$0,08 \pm 0,006$</td><td>$8,79 \pm 0,07$</td><td><ld< td=""><td>0.08 ± 0.006</td><td>$0,26 \pm 0,009$</td><td>0.03 ± 0.009</td><td>$10,0 \pm 0,10$</td></ld<></td></ld<>	$0,04 \pm 0,005$	$0,65 \pm 0,10$	$0,08 \pm 0,006$	$8,79 \pm 0,07$	<ld< td=""><td>0.08 ± 0.006</td><td>$0,26 \pm 0,009$</td><td>0.03 ± 0.009</td><td>$10,0 \pm 0,10$</td></ld<>	0.08 ± 0.006	$0,26 \pm 0,009$	0.03 ± 0.009	$10,0 \pm 0,10$
Berbigão	<ld< td=""><td>0.13 ± 0.009</td><td><ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,008$</td><td>$0,27 \pm 0,008$</td><td>$4,01 \pm 0,193$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,38 \pm 0,011$</td><td>$0,50 \pm 0,024$</td><td>$5,5\pm0,24$</td></ld<></td></ld<></td></ld<></td></ld<>	0.13 ± 0.009	<ld< td=""><td>$0,16 \pm 0,008$</td><td>$0,27 \pm 0,008$</td><td>$4,01 \pm 0,193$</td><td><ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,38 \pm 0,011$</td><td>$0,50 \pm 0,024$</td><td>$5,5\pm0,24$</td></ld<></td></ld<></td></ld<>	$0,16 \pm 0,008$	$0,27 \pm 0,008$	$4,01 \pm 0,193$	<ld< td=""><td><ld< td=""><td>$0,38 \pm 0,011$</td><td>$0,50 \pm 0,024$</td><td>$5,5\pm0,24$</td></ld<></td></ld<>	<ld< td=""><td>$0,38 \pm 0,011$</td><td>$0,50 \pm 0,024$</td><td>$5,5\pm0,24$</td></ld<>	$0,38 \pm 0,011$	$0,50 \pm 0,024$	$5,5\pm0,24$
Ostra	$0,\!10\pm0,\!009$	$0,\!08\pm0,\!006$	<ld< td=""><td>$0,29 \pm 0,021$</td><td>$0,10\pm0,009$</td><td>$15,9\pm0,75$</td><td>$0,\!06\pm0,\!007$</td><td>$0,\!06\pm0,\!005$</td><td>$0,46 \pm 0,076$</td><td><ld< td=""><td>$17,1\pm0,84$</td></ld<></td></ld<>	$0,29 \pm 0,021$	$0,10\pm0,009$	$15,9\pm0,75$	$0,\!06\pm0,\!007$	$0,\!06\pm0,\!005$	$0,46 \pm 0,076$	<ld< td=""><td>$17,1\pm0,84$</td></ld<>	$17,1\pm0,84$

^a Espécies aniônicas de As não identificadas (EA-A) com tempo de retenção de 148 s;

^b Espécies aniônicas de As não identificadas (EA-B) com tempo de retenção de 251 s;

^c Espécies catiônicas de As não identificadas (EC-A) com tempo de retenção de 279 s;

^d Espécies catiônicas de As não identificadas (EC-B) com tempo de retenção de 360 s.

5.6. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS.

5.6.1. Determinação da concentração total de Hg em CRMs utilizando ICP-MS

Três CRMs (TORT-2, DOLT-4 e BCR-463) foram analisados para verificar a exatidão na determinação de Hg total, utilizando o método de digestão ácida em micro-ondas (método utilizado nas análises de As total) por ICP-MS. Os resultados analíticos dos CRMs, em conjunto com seus valores certificados estão descritos na Tabela XXVIII. Para controle de qualidade do método aplicado, um CRM foi analisado a cada lote de amostras (1 lote = 3 diferentes amostras em triplicata). O valor da concentração total de Hg encontrado por ICP-MS, não difere significativamente do valor certificado a um nível de 95% de confiança segundo o teste *t*-student (Tabela XXVIII). A precisão do método (CV) para determinação de Hg total foi calculada a partir de três leituras consecutivas dos CRMs. Os valores de CV foram: 3% para TORT-2, 4% para DOLT-4 e 5% BCR-463. Os valores de CV estão de acordo com a literatura ^{92,100,111}. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram calculados como três vezes (3σ) e dez vezes (10σ) o valor do desvio padrão das dez medidas do branco, respectivamente. ¹⁹³ Os resultados obtidos foram 0,008 μg Hg g⁻¹ para LD e 0,026 μg Hg g⁻¹ para LQ.

5.6.2. Análise das espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico em CRMs utilizando HPLC-UV-CV-AFS

Ibáñez-Palomino¹¹⁷ do grupo QÜESTRAM realizou testes preliminares, selecionando dois diferentes agentes extratores para a análise das principais espécies de Hg no CRM DOLT-4. Foram testados os ácidos HNO₃ (método EPA 3200)¹⁹⁹ e HCl, ambos com concentração de 4 mol L⁻¹. O presente método baseia-se numa extração assistida por microondas, cujo procedimento é descrito no item 4.6.3. Ibáñez-Palomino¹¹⁷ observou que as espécies presentes no extrato do CRM DOLT-4 são metilmercúrio e mercúrio inorgânico e que as recuperações obtidas para metilmercúrio foram de 95% e 86% com HCl e HNO₃, respectivamente. Como a recuperação do metilmercúrio, com o método de extração com HNO₃, é 9% menor do que a recuperação para a extração com HCl, este último foi selecionado como agente extrator.

A exatidão do método proposto para análise de especiação do CH₃Hg⁺ foi verificada utilizando os seguintes CRMs: BCR-463 (tecido de atum), DOLT-4 (fígado de cação) e TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta). As concentrações encontradas para a espécie de CH₃Hg⁺ para cada CRM são apresentados na Tabela XXVIII e não diferem significativamente a um nível de 95% confiança dos valores certificados. Também foi analisada a quantidade de mercúrio inorgânico nos CRMs citados anteriormente (Tabela XXVIII).

Tabela XXVIII. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para Hg Total e por HPLC-UV-HG- AFS para as espécies de Hg em CRMs. As concentrações estão expressas em μ g g⁻¹ de Hg em massa seca (média \pm desvio padrão, n = 3).

CRMs	Total Hg	CH ₃ Hg ⁺	Hg^{2+}	Soma das espécies	Recuperação (%)
TORT-2	$0,30 \pm 0,01$	$0,161 \pm 0,010$	$0,081 \pm 0,002$	$0,24 \pm 0,012$	80
	$0,27 \pm 0,06^{a}$	$0,152 \pm 0,013^{a}$			
DOLT-4	$2,68 \pm 0,11$	$1,270 \pm 0,041$	$1,190 \pm 0,023$	2,46 ± 0,064	92
	$2,58 \pm 0,22^{a}$	$1,330 \pm 0,120^{a}$			
BCR-463	$2,86 \pm 0,15$	$2,780 \pm 0,160$	$0,160 \pm 0,200$	$2,94 \pm 0,360$	102
	$2,85 \pm 0,16^{a}$	$3,040 \pm 0,160^{a}$			

^a Valor certificado: média ± desvio-padrão.

A Figura 30 exibe um cromatograma do CRM DOLT-4 com as espécies de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ com o método de especiação proposto por este trabalho utilizando HPLC-UV-CV-AFS. A recuperação para cada CRM foi calculada através da soma das concentrações de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, obtido pelo método de especiação proposto (HPLC-UV-CV-AFS) e concentração de Hg total (ICP-MS). Foi considerado 100% a concentração total de Hg no cálculo dos valores de recuperação. As recuperações para os três CRMs apresentou uma variabilidade de 80-102% como pode ser observado na Tabela XXVIII, concordando com a literatura¹⁰⁸.

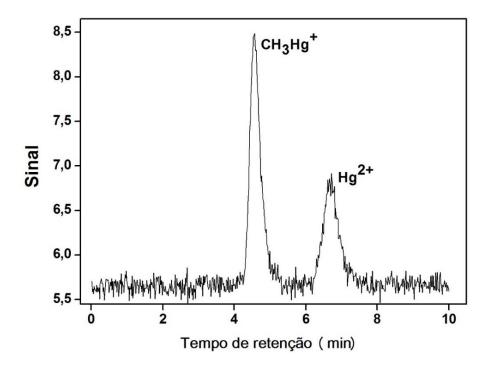


Figura 30. Cromatograma do extrato DOLT-4 utilizando HPLC-UV-CV-AFS.

5.6.2.1. Parâmetros de Mérito

A determinação dos valores de LD e LQ foi baseado segundo o trabalho de Ibáñez-Palomino *et al.*¹¹⁶ calculados para as espécies de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺. Para calcular LD e LQ, o desvio padrão da linha de base foi multiplicado por 3 ou 10 (LD e LQ respectivamente) e dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração em altura de pico. Os valores de LD foram 0,0025 e 0,0030 μg g⁻¹ para CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ respectivamente. Os valores de LQ foram 0,0084 e 0,0100 μg g⁻¹ para CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ respectivamente.

5.6.2.2. Testes de Recuperação

Adicionalmente, o método de especiação proposto também foi validado através da recuperação do analito adicionado nas amostras. Padrões de CH_3Hg^+ foram adicionados nas amostras de atum-2, abrótea-2, camarão-1, berbigão e o CRM BCR-463. Depois de fortificadas com o respectivo padrão, as amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos. Os valores de recuperação encontrados para as amostras atum-2, abrótea-2, camarão-1, berbigão e o CRM BCR-463 foram 93 ± 3 , 85 ± 5 , 93 ± 2 , 87 ± 4 e 97 ± 2 (média % \pm desvio padrão, n=3), respectivamente. Os valores de recuperação foram calculados de acordo com a

literatura⁹⁹ e demonstraram índices de recuperação satisfatórios para metilmercúrio. A Figura 31 exibe os cromatogramas dos extratos das amostras atum-2, abrótea-2, camarão-1 e berbigão. A amostra atum-2 foi fortificada com 0,200 µg g⁻¹ de CH₃Hg⁺; abrótea-2 com 0,350 µg g⁻¹ de CH₃Hg⁺, camarão-1 e berbigão, com 0,100 µg g⁻¹ de CH₃Hg⁺. Como pode ser visto na Figura 31 o metilmercúrio foi satisfatoriamente recuperado nessas quatro amostras.

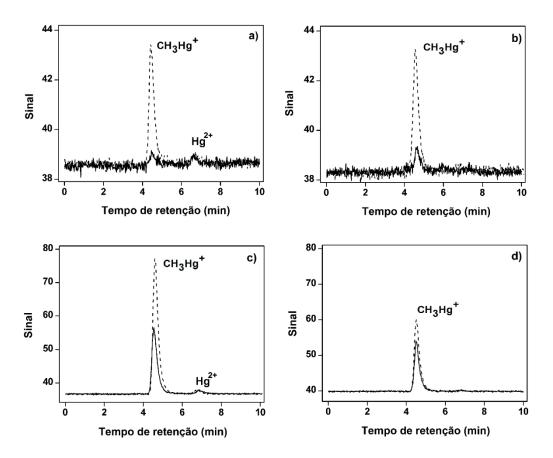


Figura 31. Cromatogramas dos extratos a) berbigão b) camarão-1 c) abrótea-2 d) atum- 2 (linha contínua: amostra não fortificada e linha pontilhada: amostra fortificada) com CH₃Hg⁺ utilizando HPLC-UV-CV-AFS.

5.6.3. Determinação de Hg total nas amostras de pescado e frutos do mar utilizando ICP-MS

Foi determinada a concentração de Hg total nas 22 amostras utilizando o mesmo método na análise de As total. As amostras foram classificadas em peixes (n=14), crustáceos (n=3) e bivalves (n=5). As concentrações foram determinadas utilizando ICP-MS e estão descritas na Tabela XXIX. Estudos prévios realizados por Carmen *et al.* ¹¹⁷, foi observado que utilizando o método proposto por este trabalho, com as técnicas de ICP-MS e CV-AFS, na determinação de

Hg total em CRMs de pescado e frutos do mar, os resultados encontrados não apresentaram diferença significativa do seu valor certificado para ambas as técnicas. Além disso, a técnica de ICP-MS possui característica multi-elementar, consequentemente, foi decidido analisar As e Hg total utilizando o mesmo método nas 22 amostras descritas neste estudo.

A concentração de Hg total nas amostras analisadas apresentou uma variabilidade de $0.03-2.49~\mu g~g^{-1}$, sendo que as amostras de crustáceos e bivalves apresentaram concentrações menores para Hg total do que as amostras de pescado. A concentração média de Hg total nas amostras de crustáceos e bivalves foi de $0.07~\mu g~g^{-1}$, enquanto nas amostras de pescado foi de $0.68~\mu g~g^{-1}$. Esta diferença nos valores de concentração para Hg total em amostras de pescado e frutos do mar, também foi confirmada por Batista 92 e Clémens *et al.* 108 . De acordo com Clémens *et al.* 108 , diferenças significativas nos níveis de Hg total são encontradas nas mais diversas espécies de pescado e frutos do mar. Os peixes de alto nível trófico da cadeia alimentar, como peixes predadores, tendem acumular mais Hg, consequentemente seus níveis de concentração são significativamente mais elevados. Na Tabela XXIX, observa-se que o peixe predador do Brasil (pargo: $1.71~\pm~0.010~\mu g~g^{-1}$) e dois predadores da Espanha (atum-1: $2.49~\pm~0.033~\mu g~g^{-1}$ e peixe-espada-1: $1.49~\pm~0.030~\mu g~g^{-1}$) apresentaram altos níveis de Hg total em comparação a outros peixes.

O governo brasileiro, através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, instituiu um valor de referência de 0,5 μ g g⁻¹ de Hg total em peixes de cultivo e 1 μ g g⁻¹ para peixes predadores^{4,123}. Das quatro amostras brasileiras, apenas o pargo está acima do valor recomendado pelo governo brasileiro (Tabela XXIX). Todas as amostras da Espanha apresentaram concentrações de Hg total abaixo dos níveis máximos estabelecidos pelo Regulamento (CE) Nº 1881/2006¹²⁰ (0,5 μ g g⁻¹ para peixes e alguns crustáceos e 1 μ g g⁻¹ para outros), exceto as amostras de atum-1 e peixe espada-1 (2,49 \pm 0,033 μ g g⁻¹ e 1,49 \pm 0,030 μ g g⁻¹ de Hg total, respectivamente). Estes dados demonstram a necessidade de realizar a especiação em amostras de pescado e frutos do mar para discernir as espécies tóxicas e não tóxicas.

Tabela XXIX. Resultados analíticos obtidos por ICP-MS para Hg total nas amostras de pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em μg g⁻¹ de Hg em massa seca (média \pm desvio padrão, n=3).

Amostras	Espécies	Nome comercial	Origem	Total Hg
Peixes				
	Urophycis cirrata	Abrótea-1	Brasil	$0,28 \pm 0,010$
	Pagrus pagrus	Pargo	Brasil	$1,71 \pm 0,010$
	Merluccius hubbsi	Merluza-1	Brasil	$0,56 \pm 0,011$
	Merluccius gayi	Merluza-2	Brasil	$0,28 \pm 0,010$
	Phycis blennoides	Abrótea-2	Espanha	$0,44 \pm 0,027$
	Sardina pilchardus	Sardinha	Espanha	$0,05 \pm 0,001$
	Salmo sp,	Salmão-1	Espanha	$0,03 \pm 0,001$
	Salmo sp,	Salmão-2	Espanha	$0,03 \pm 0,002$
	Thunnus sp,	Atum-1	Espanha	$2,49 \pm 0,033$
	Thunnus sp,	Atum-2	Espanha	$0,20 \pm 0,012$
	Luvarus imperialis	Peixe Sol	Espanha	$0,86 \pm 0,040$
	Xiphias gladius	Peixe Espada-1	Espanha	$1,49 \pm 0,030$
	Xiphias gladius	Peixe Espada-2	Espanha	$0,36 \pm 0,028$
	Xiphias gladius	Peixe Espada-3	Espanha	$0,80 \pm 0,010$
Crustáceos				
	Aristeus antennatus	Camarão-1	Espanha	$0,05 \pm 0,002$
	Aristaeopsis edwardsiana	Camarão-2	Espanha	< LD
	Crangon crangon	Camarão-3	Espanha	< LD
Bivalves				
	Tapes pullastra	Marisco-1	Espanha	$0,09 \pm 0,001$
	Tapes Decussatus	Marisco-2	Espanha	$0,09 \pm 0,001$
	Mytilus edulis	Mexilhão	Espanha	< LD
	Cerastoderma edule	Berbigão	Espanha	$0,06 \pm 0,002$
	Ostrea sp,	Ostra	Espanha	$0,06 \pm 0,001$

5.6.4. Análise das espécies de metilmercúrio e mercúrio inorgânico nas amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-UV-CV-AFS

Devido à toxicidade do metilmercúrio a discussão dos resultados terá um enfoque maior nessa espécie. Na Tabela II são descritas as concentrações de CH₃Hg⁺, diferentes métodos de extração e técnicas utilizadas na determinação dessa espécie, encontradas na literatura a partir de 2009. Os níveis de CH₃Hg⁺ variam amplamente, dependendo do tipo de extração e do método de detecção utilizado. De acordo com a Tabela II, as concentrações de CH₃Hg⁺ apresentaram uma variabilidade de 0,001 a 3,2 μg g⁻¹ para as amostras de pescado e frutos do mar. Entretanto, as amostras de frutos do mar apresentaram concentrações menores que as amostras de pescado. Zhang *et al.* ¹⁰⁹ encontraram concentrações que variaram de 0,022 a 0,034 μg g⁻¹ de CH₃Hg⁺ em amostras de mexilhão e mariscos utilizando a técnica de geração de vapor eletroquímico acoplada a espectrometria de fluorescência atômica (EVG-AFS). Clémens *et al.* ¹⁰⁸ encontraram valores de 0,001 a 0,033 μg g⁻¹ de CH₃Hg⁺ em amostras de mexilhão, ostras, vieiras e camarão utilizando a diluição isotópica com cromatografia gasosa acoplada ao ICP-MS (ID-GC-ICP-MS). Já Batista *et al.* ⁹² utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS encontraram concentrações de 0,003 a 0,037 μg g⁻¹ de CH₃Hg⁺ em amostras de mexilhão, polvo, camarão e lula.

Neste estudo, as espécies de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ foram analisadas em 22 amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-UV-CV-AFS. Os resultados estão descritos na Tabela XXX. Para todas as amostras analisadas, a soma das concentrações das espécies de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ (obtidas pelo método de especiação proposto por este trabalho) foi comparado com a concentração de Hg total (obtido pelo método com ICP-MS). A concentração de Hg total foi considerada como 100% para os cálculos dos valores de recuperação. Todas as amostras analisadas apresentaram valores de recuperação de 88 a 120% (Tabela XXX). Estes valores de recuperação estão de acordo com a literatura^{93,108,111}. Assim, a estreita correlação entre o valor de concentração de Hg total e a soma das espécies de mercúrio é alcançado, independentemente da composição da matriz.

Observando a Tabela XXX, a espécie majoritária CH_3Hg^+ foi encontrada em todas as amostras de pescado (porcentagem média de CH_3Hg^+ de 98%), sendo que a concentração média encontrada nessas amostras foi de 0,66 µg Hg g^{-1} na forma de CH_3Hg^+ . Apenas em três amostras de frutos do mar foi encontrado CH_3Hg^+ (camarão-1, marisco-2 e berbigão). A porcentagem média foi de 49% e a concentração média foi de 0,027 µg Hg g^{-1} na forma de CH_3Hg^+ . As amostras de pescado: pargo $(1,75\pm0,041~\mu g~g^{-1})$, atum-1 $(2,38\pm0,037~\mu g~g^{-1})$ e peixe-espada-1 $(1,49\pm0,043~\mu g~g^{-1})$ apresentaram os maiores valores de concentração para

 CH_3Hg^+ . Apenas essas três amostras analisadas não estão dentro dos níveis máximos estabelecidos pelo Regulamento(CE) N ° $1881/2006^{120}$ para metilmercúrio, pois apresentaram concentrações maiores que 1 $\mu g g^{-1}$.

Em algumas amostras também foi detectado mercúrio inorgânico. A Tabela XXX mostra que os valores de concentração para Hg²+ apresentou uma variabilidade de 0,014 a 0,091 μg g⁻¹ em amostras de pescado e 0,042 a 0,098 μg g⁻¹ em amostras de frutos do mar. No entanto, Hg²+ foi quantificado em apenas em quatro das oito amostras de frutos do mar. Estes dados evidenciam a importância da análise de especiação nesse tipo de matriz. A mesma torna possível a identificação das espécies mais nocivas aos seres humanos, consequentemente informar se os alimentos, como peixes e frutos do mar, são adequados ou não para o consumo.

De acordo com os dados reportados na literatura (Tabela II), as concentrações de metilmercúrio são maiores em peixes do que em frutos do mar, além disso, os peixes predadores apresentam concentrações, ainda maiores. As concentrações de metilmercúrio encontradas pelo método proposto (Tabela XXX) estão dentro da faixa de concentração descritos por diversos autores da literatura (Tabela II). Fitzgerald *et al.*²⁰⁰ afirmaram que o comportamento químico do Hg em ambiente marinho e o número de peixes predadores analisados explicam as diferenças encontradas nos valores de metilmercúrio em diversos estudos. As condições do ambiente aquático, a idade de cada espécie e do tempo de exposição ao mercúrio, também são fatores que afetam os resultados. Os dados reportados da literatura (Tabela II), além dos dados encontrados neste trabalho (Tabela XXX) evidenciam que há uma ampla variabilidade na concentração de metilmercúrio em diferentes espécies de pescado e frutos do mar. Estas diferenças reafirmam a necessidade de monitorar as concentrações de metilmercúrio neste tipo de matriz e em diferentes áreas, a fim de evitar a contaminação humana.

Apesar da falta de legislação brasileira e europeia que regulamenta os níveis máximos de metilmercúrio em pescado e frutos do mar, os resultados apresentados neste trabalho têm contribuído para um aumento na disponibilidade de resultados confiáveis de metilmercúrio neste tipo de amostra, podendo ser aplicado em futuras diretrizes e em outros produtos alimentares. Consequentemente, o presente método pode ser uma ferramenta valiosa para os laboratórios de controle de alimentos que avaliam metilmercúrio em amostras de pescado e frutos do mar.

Tabela XXX. Resultados analíticos obtidos por HPLC-UV-CV-AFS para as espécies de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de pescado e frutos do mar. Os resultados estão expressos em $\mu g \ g^{-1}$ de Hg em massa seca (média \pm desvio padrão, n=3).

Amostras	CH ₃ Hg ⁺	CH ₃ Hg ⁺ (%) Hg ²⁺ Soma das espéci		Soma das espécies	Recuperação (%)
Abrótea-1	0.32 ± 0.001	100	<ld< td=""><td>$0,32 \pm 0,001$</td><td>114</td></ld<>	$0,32 \pm 0,001$	114
Pargo	$1,75 \pm 0,041$	96	$0,064 \pm 0,0092$	$1,81 \pm 0,050$	105
Merluza-1	$0,64 \pm 0,02$	97	$0,020 \pm 0,0021$	$0,66 \pm 0,022$	117
Merluza-2	0.32 ± 0.054	100	<ld< td=""><td>0.32 ± 0.054</td><td>114</td></ld<>	0.32 ± 0.054	114
Abrótea-2	$0,47 \pm 0,01$	98	0.014 ± 0.003	$0,48 \pm 0,013$	109
Sardinha	$0,050 \pm 0,002$	100	<ld< td=""><td>$0,050 \pm 0,002$</td><td>100</td></ld<>	$0,050 \pm 0,002$	100
Salmão-1	$0,031 \pm 0,001$	100	<ld< td=""><td>$0,031\pm0,001$</td><td>103</td></ld<>	$0,031\pm0,001$	103
Salmão-2	$0,036 \pm 0,003$	100	<ld< td=""><td>$0,036 \pm 0,003$</td><td>120</td></ld<>	$0,036 \pm 0,003$	120
Atum-1	$2,38 \pm 0,037$	96	0.091 ± 0.004	$2,47 \pm 0,041$	99
Atum-2	$0,194 \pm 0,008$	100	<ld< td=""><td>0.194 ± 0.008</td><td>97</td></ld<>	0.194 ± 0.008	97
Peixe Sol	$0,92 \pm 0,030$	99	0.015 ± 0.001	0.93 ± 0.031	108
Peixe Espada-1	$1,49 \pm 0,043$	98	0.034 ± 0.002	$1,52 \pm 0,045$	102
Peixe Espada-2	0.37 ± 0.033	100	<ld< td=""><td>0.37 ± 0.033</td><td>102</td></ld<>	0.37 ± 0.033	102

Peixe Espada-3	0.83 ± 0.040	100	<ld< th=""><th>0.83 ± 0.040</th><th>103</th></ld<>	0.83 ± 0.040	103
Camarão-1	$0,044 \pm 0,003$	100	<ld< th=""><th>$0,044 \pm 0,003$</th><th>88</th></ld<>	$0,044 \pm 0,003$	88
Camarão-2	<ld< th=""><th>-</th><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	-	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th></ld<>	-
Camarão-3	<ld< th=""><th>-</th><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	-	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th></ld<>	-
Marisco-1	<ld< th=""><th>-</th><th>$0,098 \pm 0,004$</th><th>$0,098 \pm 0,004$</th><th>108</th></ld<>	-	$0,098 \pm 0,004$	$0,098 \pm 0,004$	108
Marisco-2	$0,013 \pm 0,001$	13	$0,086 \pm 0,001$	$0,099 \pm 0,002$	110
Mexilhão	<ld< th=""><th>-</th><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	-	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th></ld<>	-
Berbigão	$0,024 \pm 0,001$	36	$0,042 \pm 0,002$	$0,066 \pm 0,003$	110
Ostra	<ld< th=""><th>-</th><th>$0,060 \pm 0,001$</th><th>$0,060 \pm 0,001$</th><th>100</th></ld<>	-	$0,060 \pm 0,001$	$0,060 \pm 0,001$	100

Zmozinski, A.V. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO EM AMOSTRAS DE PESCADO IN NATURA UTILIZANDO SS-GF AAS.

Os métodos desenvolvidos para a determinação de cádmio e chumbo em amostras de pescado *in natura* são exatos e precisos. Estes métodos mostraram-se rápidos e sensíveis utilizando somente um simples procedimento de homogeneização, em conjunto com o uso de calibração com padrões aquosos. O procedimento é adequado para aplicação de rotina, evitando o procedimento de digestão usado para GF AAS ou o pré-tratamento de moagem e secagem ou liofilização adotado pela micro-análise utilizando SS-GF AAS. Este estudo mostra que a amostragem direta de sólidos por GF AAS pode ser aplicada para estes elementos como um rápido procedimento de *screening* em um método de referência dentro do âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, assistindo a implementação e manutenção do controle sanitário.

6.2. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO LIOFILIZADAS UTILIZANDO SS-GF AAS, SS-HR-CS-GF AAS E ICP-MS E ARSENOBETAÍNA UTILIZANDO HPLC-ICP-MS

Em relação à determinação de As pode-se concluir que os valores encontrados para os CRMs e para as amostras de pescado liofilizadas, utilizando as técnicas de SS-LS-GF AAS, SS-HR-CS-GF AAS e também para os diferentes métodos de digestão aplicados, não diferem significativamente a um nível de 95% de confiança conforme o teste estatístico ANOVA. Entretanto, apesar de concordantes, estes valores encontrados estão abaixo do valor certificado. Com o uso da técnica de SS-HR-CS-GF AAS, evidenciou-se a presença de interferências espectrais que apesar de serem corrigidas não permitiram a obtenção do valor certificado correto. O coeficiente de correlação obtido a partir da curva de correlação realizada neste trabalho, não foi satisfatório. O valor inadequado do coeficiente de correlação pode ter sido ocasionado pelas diferentes características intrínsecas dos CRMs utilizados. Para o uso dessa técnica, seria necessário investigar um número maior de CRMs, na tentativa de se obter uma melhor correlação.

Os resultados obtidos para a determinação do As total, com o ICP-MS, não são estatisticamente diferentes dos valores certificados. Altas concentrações de AB, determinadas

Zmozinski, A.V. CONCLUSÕES

por HPLC-ICP-MS, foram encontradas em todos os CRMs e amostras quando comparadas com a concentração de As total. Este fato sugere que a AB pode ser a causa das diferenças encontradas na determinação de As total por GF AAS, dentro das condições utilizadas neste trabalho. Este resultado enfatiza que mais investigações devem ser realizadas para a determinação correta do valor total de As em amostras de peixe por GF AAS. Como a AB é um composto considerado não tóxico para humanos, o método investigado nesse trabalho, utilizando a técnica de GF AAS, pode ser utilizada para a determinação das espécies tóxicas de arsênio nas amostras de pescado.

6.3. DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-ICP-MS

O método proposto para análise de especiação de As em amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-ICP-MS foi adequado na separação de dez espécies de arsênio, sendo que seis delas (iAs, DMA, MA, AC, TMAO e AB) puderam ser identificadas e quantificadas. Além disso, o acoplamento entre as técnicas de HPLC e ICP-MS é simples, não necessitando modificar os equipamentos convencionais, além de apresentar boa reprodutibilidade entre as medições. Os valores de LD e LQ foram satisfatórios na determinação das espécies de DMA, MA, AC, TMAO, AB e iAs pelo método desenvolvido neste trabalho. Devido à ausência de materiais de referência certificados para arsênio inorgânico em matrizes semelhantes a de peixes e frutos do mar a validação foi realizada através da recuperação do analito. As recuperações encontradas apresentaram uma variabilidade de 100 a 106%, demonstrando satisfatórios índices de recuperação para arsênio inorgânico.

O governo brasileiro, através do MAPA instituiu um valor de referência de 1 µg g⁻¹ de As total em amostras de pescado e frutos do mar⁴. Os valores encontrados neste trabalho estão acima dos valores recomendados pelo governo brasileiro. Embora as amostras apresentem altos níveis de As total, a espécie dominante é a AB, (cerca de 66% para frutos do mar, e 95% para os peixes), considerada não-tóxico.

A AB foi a espécie predominante em todas as amostras analisadas. Já a espécie de arsênio inorgânico (espécie de mais alta toxicidade) não foi encontrada nas amostras de pescado, somente em bivalves e crustáceos, concordando com a literatura.

Zmozinski, A.V. CONCLUSÕES

6.4. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL E DAS ESPÉCIES DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PESCADO E FRUTOS DO MAR DO BRASIL E DA ESPANHA UTILIZANDO ICP-MS E HPLC-UV-CV-AFS

O método proposto para análise das espécies de metilmercúrio e mercúrio inorgânico em amostras de pescado e frutos do mar utilizando HPLC-UV-CV-AFS demonstrou ser eficiente. Através dos CRMs analisados o método é exato para a espécie metilmercúrio. O método também é simples e rápido em comparação a outros métodos encontrados na literatura. Os valores de LD e LQ para as espécies de metilmercúrio e mercúrio inorgânico, obtidos com o método desenvolvido neste trabalho, foram satisfatórios. As recuperações encontradas para metilmercúrio apresentaram uma variabilidade de 85 a 97%, demonstrando índices de recuperação satisfatórios para essa espécie. Em relação ao conteúdo total de mercúrio, das quatro amostras brasileiras que foram analisadas, apenas uma apresentou acima do valor recomendado pelo governo brasileiro. Em relação às da Espanha, duas apresentaram concentrações de Hg total acima dos níveis máximos estabelecidos pelo Regulamento (CE) N° 1881/2006¹²⁰. Em contraste com os dados obtidos para As, a espécie de mais alta toxicidade (metilmercúrio) foi a espécie predominante em todas as amostras de pescado. Porém em apenas três amostras analisadas não estão dentro dos níveis máximos estabelecidos pelo Regulamento (CE) N ° 1881/2006¹²⁰ para metilmercúrio, pois apresentaram concentrações maiores que $1 \mu g g^{-1}$.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Ersoy, B.Özeren, A.; Food Chem., 2009, 115, 419.
- 2. MPA -, http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C 3 % Adstico%20MPA%202010.pdf Site acessado em 06/03/2014.
- 3. Queiroz, M.A.Lins, E.S.; Food Addit Contam, Part A, 2012, 29, 482.
- 4. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (2012). Instrução Normativa nº 11, Brasília.
- 5. Taylor, A.; Day, M.P.; Hill, S.; Marshall, J.; Patriarca, M.White, M.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2013**, 28, 425.
- 6. Korn, M.G.A.; Morte, E.S.B.; Santos, D.C.M.B.; Castro, J.T.; Barbosa, J.T.P.; Teixeira, A.P.; Fernandes, A.P.; Welz, B.; Santos, W.P.C.Santos, E.B.G.N.; *Appl Spectrosc Rev*, **2008**, *43*, 67.
- 7. Sardans, J.; Montes, F.Peñuelas, J.; Spectrochim Acta, Part B, 2010, 65, 97.
- 8. Kurfürst, U.; Solid sample analysis: Direct and slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP; Springer: Berlin, 1998.
- 9. Francesconi, K.A. Kuehnelt, D.; Analyst, 2004, 129, 373.
- 10. Geng, W.; Komine, R.; Ohta, T.; Nakajima, T.; Takanashi, H.Ohki, A.; *Talanta*, **2009**, 79, 369.
- 11. Borak, J.Hosgood, H.D.; Regul. Toxicol. Pharm., 2007, 47, 204.
- 12. Lin, H.-T.; Chen, S.-W.; Shen, C.-J.Chu, C.; Journal of Food & Drug Analysis, 2008, 16.
- 13. Crespo-López, M.E.; Macêdo, G.L.; Pereira, S.I.; Arrifano, G.P.; Picanço-Diniz, D.L.; Nascimento, J.L.M.d.Herculano, A.M.; *Pharmacol. Res.*, **2009**, *60*.
- 14. Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.-G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H.P.Lobinski, R.; *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72.
- 15. Ibáñez-Palomino, C.; López-Sánchez, J.F.Sahuquillo, A.; Anal. Chim. Acta, 2012, 720, 9.
- 16. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), European Food Safety Authority (2009) EFSA J 7:1351. p 198.
- 17. Feldmann, J.Krupp, E.M.; Anal Bioanal Chem, 2011, 399, 1735.
- 18. Braun, L.Cohen, M.; *Herbs & natural supplements: an evidence-based guide*; Elsevier Australia, 2010.
- 19. Lee, J.H.; O'Keefe, J.H.; Lavie, C.J.Harris, W.S.; Nature Reviews Cardiology, 2009, 6, 753.
- 20. Innis, S.M.; The Journal of nutrition, 2007, 137, 855.

- 21. Nunes, M.L.; Bandarra, M.Batista, I.; *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 2.
- 22. Sikorski, Z.Z.Kolakowska, A.; Chemical and functional properties of food lipids; CRC Press, 2002.
- 23. Lichtenstein, A.H.; Appel, L.J.; Brands, M.; Carnethon, M.; Daniels, S.; Franch, H.A.; Franklin, B.; Kris-Etherton, P.; Harris, W.S.Howard, B.; *Circulation*, **2006**, *114*.
- 24. SEBRAE http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/Sebrae%202014/Ideias%20de%20negocios/Agronegocios%20-%20Pscicultura%20-%20Criacao%20de%20Peixes01.pdf Site acessado em 06/03/2014.
- 25. MPA Governo Brasileiro, http://www.mpa.gov.br/index.php/internacional/comercio-internacional/omc- Site acessado em 06-03-14.
- 26. Alam, M.; Tanaka, A.; Allinson, G.; Laurenson, L.; Stagnitti, F.Snow, E.; *Ecotoxicology and environmental safety*, **2002**, *53*, 348.
- 27. Mendil, D.; Doğan Uluözlü, Ö.; Hasdemir, E.; Tüzen, M.; Sari, H.Suiçmez, M.; Food Chem., 2005, 90, 175.
- 28. Magalhães, M.C.; Costa, V.; Menezes, G.M.; Pinho, M.R.; Santos, R.S.Monteiro, L.R.; *Marine pollution bulletin*, **2007**, *54*.
- 29. Türkmen, M.; Türkmen, A.; Tepe, Y.; Töre, Y.Ateş, A.; Food Chem., 2009, 113.
- 30. Castro-González, M.Méndez-Armenta, M.; Environ. Toxicol. Pharmacol., 2008, 26.
- 31. Klaassen, C.D.; Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons; McGraw-Hill New York, 2001.
- 32. DeMan, J.M.; Principles of food chemistry; Springer, 1999.
- 33. Eisler, R.; Mercury hazards to living organisms; CRC Press, 2010.
- 34. Sivaperumal, P.; Sankar, T.Viswanathan Nair, P.; Food Chem., 2007, 102.
- 35. Weaver, J.Frederikse, H.; J. Am. Chem. Soc., 2007, 129.
- 36. Craig, P.J.; Organometallic compounds in the environment; principles and reactions; Wiley, 1986.
- 37. Chancho, M.J.R.; Sánchez, J.F.L.Rubio, R.; J. Appl. Phycol., 2010, 22, 465.
- 38. Gomez-Caminero, A.; Howe, P.; Hughes, M.; Kenyon, E.; Lewis, D.; Moore, M.; Ng, J.; Aitio, A.Becking, G.; World Health Organization. Eds. World Health Organization, Geneve, 2001.
- 39. Leermakers, M.; Baeyens, W.; De Gieter, M.; Smedts, B.; Meert, C.; De Bisschop, H.; Morabito, R.Quevauviller, P.; *TrAC*, *Trends Anal. Chem.*, **2006**, *25*.

- 40. Rahman, M.M.; Sengupta, M.K.; Ahamed, S.; Chowdhury, U.K.; Hossain, M.A.; Das, B.; Lodh, D.; Saha, K.C.; Pati, S.Kaies, I.; *Sci. Total Environ.*, **2005**, *338*.
- 41. Mandal, B.K.Suzuki, K.T.; Talanta, 2002, 58.
- 42. Wood, J.M.; Science, 1974, 183.
- 43. Pirrone, N.Mahaffey, K.R.; Where we stand on mercury pollution and its health effects on regional and global scales; Springer, 2005.
- 44. Berzas Nevado, J.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.; Guzmán Bernardo, F.; Jiménez Moreno, M.; Herculano, A.; do Nascimento, J.Crespo-López, M.; *Environment international*, **2010**, *36*.
- 45. Morel, F.M.; Kraepiel, A.M.Amyot, M.; Annual review of ecology and systematics, 1998, 29.
- 46. Bisinoti, M.C.Jardim, W.F.; Quim. Nova, 2004, 27.
- 47. Azevedo, F.A.d.; in *Toxicologia do mercúrio*, RIMA/INTERTOX, 2003.
- 48. Selin, N.E.; Annual Review of Environment and Resources, 2009, 34.
- 49. Baird, C.Cann, M.; Environmental chemistry; Macmillan, 2005.
- 50. Smith, K.L.Guentzel, J.L.; Marine pollution bulletin, 2010, 60.
- 51. Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.d.; Inácio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M.; Mugnai, R.Baptista, D.F.; *Ciência e saúde coletiva*, **2007**, *12*.
- 52. Porto, L.C.S.Ethur, E.M.; Ciência Rural, 2009, 39.
- 53. Rainbow, P.S.; Marine pollution bulletin, 1995, 31.
- 54. Site G1- Natureza Contaminação por mercúrio dobra nos mares em cem anos, http://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/12/contaminacao-por-mercurio-dobra-nos-mares-em-cem-anos-diz-estudo.html. Site acessado 13-03-2014.
- 55. Uluozlu, O.D.; Tuzen, M.; Mendil, D.Soylak, M.; Food Chem., 2007, 104.
- 56. Pinto, F.; Rey, U.; Ansaloni, L.; Andrada, D.Silva, J.; Eclética Química, 2005, 30.
- 57. Ruangsomboon, S. Wongrat, L.; Aquat. Toxicol., 2006, 78.
- 58. Fowler, B.A.; Nordberg, G.F.; Nordberg, M.Friberg, L.; *Handbook on the Toxicology of Metals*; Academic Press, 2011.
- 59. Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.Beyersmann, D.; Toxicology, 2003, 192.
- 60. CONAMA Conselho Nacional do Meio ambiente, "RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005," 2005. [Online]. http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf. Site acessado em 03 de abril de 2014.

- 61. Virga, R.H.P.; Geraldo, L.P.Santos, F.H.d.; Food Science and Technology (Campinas), 2007, 27.
- 62. International Union for Pure and Applied Chemistry, http://www.iupac.org Site acessado em 28 de março de 2014.
- 63. Francesconi, K.A.; Pure Appl. Chem., 2010, 82, 373.
- 64. ATSDR, U.; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology, Atlanta, GA, 2007.
- 65. Reyes, L.H.; Mar, J.L.G.; Rahman, G.M.M.; Seybert, B.; Fahrenholz, T.Kingston, H.M.S.; *Talanta*, **2009**, 78, 983.
- 66. Lai, V.W.-M.; Sun, Y.; Ting, E.; Cullen, W.R.Reimer, K.J.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**, *198*, 297.
- 67. Rubio, R.; Ruiz-Chancho, M.López-Sánchez, J.; TrAC, Trends Anal. Chem., 2010, 29.
- 68. Leufroy, A.; Noël, L.; Dufailly, V.; Beauchemin, D.Guérin, T.; Talanta, 2011, 83, 770.
- 69. Foster, S.; Maher, W.; Krikowa, F.Apte, S.; Talanta, 2007, 71, 537.
- 70. Pétursdóttir, A.H.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E.M.Feldmann, J.; Food Chem., 2014, 150, 353.
- 71. Baer, I.; Baxter, M.; Devesa, V.; Vélez, D.; Raber, G.; Rubio, R.; Llorente-Mirandes, T.; Sloth, J.J.; Robouch, P.de la Calle, B.; *Food Control*, **2011**, *22*, 1928.
- 72. Dufailly, V.; Noel, L.; Fremy, J.-M.; Beauchemin, D.Guerin, T.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2007**, 22, 1168.
- 73. Moreda-Piñeiro, A.; Peña-Vázquez, E.; Hermelo-Herbello, P.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, J.; Alonso-Rodríguez, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.n.Prada-Rodríguez, D.o.; *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 9272.
- 74. Santos, C.M.M.; Nunes, M.A.G.; Barbosa, I.S.; Santos, G.L.; Peso-Aguiar, M.C.; Korn, M.G.A.; Flores, E.M.M.Dressler, V.L.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2013**, *86*, 108.
- 75. Edmonds, J.; Shibata, Y.; Prince, R.; Francesconi, K.Morita, M.; *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **1994**, 74.
- 76. Pétursdóttir, Á.; Gunnlaugsdóttir, H.; Jörundsdóttir, H.; Mestrot, A.; Krupp, E.Feldmann, J.; *Anal Bioanal Chem*, **2012**, *404*, 2185.
- 77. Pétursdóttir, Á.H.; Gunnlaugsdóttir, H.; Jörundsdóttir, H.; Raab, A.; Krupp, E.M.Feldmann, J.; *Pure Appl. Chem.*, **2012**, *84*, 191.
- 78. Francesconi, K.A.; Appl. Organomet. Chem., 2003, 17.
- 79. Hirata, S.; Toshimitsu, H.Aihara, M.; Anal. Sci., 2006, 22, 39.

- 80. Sloth, J.J.; Larsen, E.H.Julshamn, K.; J. Agric. Food. Chem., 2005, 53, 6011.
- 81. Cao, X.; Hao, C.; Wang, G.; Yang, H.; Chen, D.Wang, X.; Food Chem., 2009, 113, 720.
- 82. Larsen, E.; Engman, J.; Sloth, J.; Hansen, M.Jorhem, L.; Anal Bioanal Chem, 2005, 381, 339.
- 83. Baeyens, W.; Gao, Y.; De Galan, S.; Bilau, M.; Van Larebeke, N.Leermakers, M.; *Molecular Nutrition & Food Research*, **2009**, *53*, 558.
- 84. Cava-Montesinos, P.; Nilles, K.; Cervera, M.L.Guardia, M.d.l.; Talanta, 2005, 66, 895.
- 85. Nischwitz, V.Pergantis, S.A.; Anal. Chem., 2005, 77, 5551.
- 86. Sloth, J.J.Julshamn, K.; J. Agric. Food. Chem., 2008, 56, 1269.
- 87. Cornelis, R.; Handbook of Elemental Speciation, Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health; Wiley, 2005.
- 88. Niegel, C.Matysik, F.-M.; Anal. Chim. Acta, 2010, 657.
- 89. Schmeisser, E.; Goessler, W.; Kienzl, N.Francesconi, K.A.; Analyst, 2005, 130.
- 90. Llorente-Mirandes, T., Deteminació de Compostos d'Arssénic en Mostres d'Algues Mitjançant HPLC-ICP-MS. Programa de Pós-graduação em Química da UB, Barcelona, Espanha, 2009.
- 91. Barst, B.D.; Hammerschmidt, C.R.; Chumchal, M.M.; Muir, D.C.; Smith, J.D.; Roberts, A.P.; Rainwater, T.R.Drevnick, P.E.; *Environ. Toxicol. Chem.*, **2013**, *32*, 1237.
- 92. Batista, B.L.; Rodrigues, J.L.; De Souza, S.S.; Oliveira Souza, V.C.Barbosa Jr, F.; Food Chem., **2011**, 126, 2000.
- 93. Kenšová, R.; Kružíková, K.Svobodová, Z.; Czech Journal of Food Science, 2012, 30.
- 94. Zhao, Y.; Zheng, J.; Fang, L.; Lin, Q.; Wu, Y.; Xue, Z.Fu, F.; Talanta, 2012, 89, 280.
- 95. Stoichev, T.; Amouroux, D.; Martin-Doimeadios, R.C.R.; Monperrus, M.; Donard, O.F.Tsalev, D.L.; *Applied Spectroscopy Reviews*, **2006**, *41*.
- 96. Carrasco, L.; Barata, C.; García-Berthou, E.; Tobias, A.; Bayona, J.M.Díez, S.; *Chemosphere*, **2011**, 84, 1642.
- 97. Westöö, G.; Acta Chent. Scand, 1966, 20.
- 98. Hajeb, P.; Jinap, S.Ahmad, I.; Environ. Monit. Assess., 2010, 171, 205.
- 99. Santoyo, M.M.; Figueroa, J.A.L.; Wrobel, K. Wrobel, K.; *Talanta*, **2009**, *79*, 706.
- 100. Montero-Alvarez, A.; Fernández de la Campa, M.d.R.Sanz-Medel, A.; *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2014**, *94*, 36.

- 101. Miklavčič, A.; Stibilj, V.; Heath, E.; Polak, T.; Tratnik, J.S.; Klavž, J.; Mazej, D.Horvat, M.; Food Chem., 2011, 124, 711.
- 102. Kuballa, T.; Moellers, M.; Schoeberl, K.Lachenmeier, D.W.; European Food Research and Technology, 2011, 232, 737.
- 103. Wang, Z.-h.; Yin, Y.-g.; He, B.; Shi, J.-b.; Liu, J.-f.Jiang, G.-b.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2010**, 25, 810.
- 104. Liang, P.; Shao, D.-D.; Wu, S.-C.; Shi, J.-B.; Sun, X.-l.; Wu, F.-Y.; Lo, S.; Wang, W.-X.Wong, M.H.; *Chemosphere*, **2011**, 82, 1038.
- 105. Fu, J.; Wang, Y.; Zhou, Q.Jiang, G.; Journal of Environmental Sciences, 2010, 22.
- 106. Qiu, G.; Feng, X.; Wang, S.; Fu, X.Shang, L.; Sci. Total Environ., 2009, 407, 5162.
- 107. Nevado, J.B.; Martín-Doimeadios, R.R.; Bernardo, F.G.; Moreno, M.J.; Ropero, M.P.de Marcos Serrano, A.; *Archives of environmental contamination and toxicology*, **2011**, *61*, 642.
- 108. Clémens, S.; Monperrus, M.; Donard, O.X.; Amouroux, D.Guérin, T.; *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 401, 2699.
- 109. Zhang, W.-B.; Yang, X.-A.; Dong, Y.-P.Xue, J.-J.; Anal. Chem., 2012, 84, 9199.
- 110. Li, P.; Zhang, X.Hu, B.; J. Chromatogr. A, 2011, 1218, 9414.
- 111. Chen, X.; Han, C.; Cheng, H.; Liu, J.; Xu, Z.Yin, X.; Anal. Chim. Acta, 2013, 796, 7.
- 112. Chen, X.; Han, C.; Cheng, H.; Wang, Y.; Liu, J.; Xu, Z.Hu, L.; J. Chromatogr. A, 2013, 1314, 86.
- 113. Schmidt, L.; Bizzi, C.A.; Duarte, F.A.; Dressler, V.L.Flores, E.M.; Microchem. J., 2013, 108, 53.
- 114. Sedláčková, L.; Kružíková, K.Svobodová, Z.; Food Chem., 2014, 150, 360.
- 115. Mester, Z.; Sturgeon, R.Pawliszyn, J.; Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2001, 56.
- 116. Ibáñez-Palomino, C.; López-Sánchez, J.F.Sahuquillo, À.; *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2012**, *92*, 909.
- 117. Ibáñez-Palomino, C., Metodologia Analítica per a L'Especiació de Mercuri en Mostres del Medi Aquátic. Programa de Pós-graduação em Química da UB, Barcelona, Espanha, 2012.
- 118. ANZFA (Australia New Zealand Food Authority) (2011) Standard 1.4.1 Contaminants and natural toxicants. Federal Register of Legislative Instruments F2011C00542: Issue 124, http://www.comlaw.gov.au/Details/F2011C00542.

- 119. Canadian Food Inspection Agency (2011). Certification Requirements: China. , http://www.inspection.gc.ca/food/fish-and-seafood/exports/by-jurisdiction/china/seal-products/eng/13 73555071317/1373555185449 Site acessado em março de 2014.
- 120. Commission EC (2006) Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off J Eur Commun L364:5–24.
- 121. Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (CODEX STAN 193-1995) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf.
- 122. European Food Safety Authority (EFSA): Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2985.htm, Accessed 12, 10.
- 123. Damin, I.C.; Santo, M.A.; Hennigen, R.Vargas, D.M.; *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2013**, 48, 1103.
- 124. Welz, B.Sperling, M.; Atomic absorption spectrometry; Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- 125. Taylor, A.; Day, M.P.; Hill, S.; Marshall, J.; Patriarca, M.White, M.; J. Anal. At. Spectrom., 2013, 28.
- 126. Welz, B.; High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry; Wiley, 2005.
- 127. Carioni, V.; Chelegão, R.; Naozuka, J.Nomura, C.; Accreditation and quality assurance, 2011, 16.
- 128. Santos, C.; Alava-Moreno, F.; Lavilla, I.Bendicho, C.; J. Anal. At. Spectrom., 2000, 15, 987.
- 129. dos Santos, E.J.; Herrmann, A.B.; Frescura, V.L.A.Curtius, A.J.; J. Anal. At. Spectrom., 2005, 20.
- 130. López-García, I.; Briceño, M.Hernández-Córdoba, M.; Anal. Chim. Acta, 2011, 699.
- 131. Cid, P.; Silva, C.Boia, C.; Anal Bioanal Chem, 2002, 374.
- 132. Huang, S.-J.Jiang, S.-J.; Analyst, 2000, 125.
- 133. Wibetoe, G.; Takuwa, D.T.; Lund, W.Sawula, G.; Fresenius' journal of analytical chemistry, 1999, 363.
- 134. Alves, F.d.L.; Jardim, W.d.F.; Cadore, S.; Arruda, M.A.Z.; Smichowski, P.Marrero, J.; *Quim. Nova*, **2001**, *24*.
- 135. Karadjova, I.B.; Petrov, P.K.; Serafimovski, I.; Stafilov, T.Tsalev, D.L.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2007**, *62*.
- 136. Aktar, M.W.; Sengupta, D.Chowdhury, A.; Environ. Monit. Assess., 2011, 181.
- 137. Alkan, N.; Aktas, M.Gedik, K.; Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2012, 88.

- 138. Kenšová, R.; Čelechovská, O.; Doubravová, J.Svobodová, Z.; Acta Veterinaria Brno, 2010, 79.
- 139. Pereira, L.A.; Windmöller, C.C.; Silva, J.B.B.Borges Neto, W.; Quim. Nova, 2011, 34, 1167.
- 140. Mendil, D.; Demirci, Z.; Tuzen, M.Soylak, M.; Food Chem. Toxicol., 2010, 48.
- 141. Shah, A.Q.; Kazi, T.G.; Baig, J.A.; Arain, M.B.; Afridi, H.I.; Kandhro, G.A.; Wadhwa, S.K.Kolachi, N.F.; Food Chem., 2010, 119.
- 142. Serafimovski, I.; Karadjova, I.B.; Stafilov, T.Tsalev, D.L.; Microchem. J., 2006, 83.
- 143. Nóbrega, J.A.; Santos, M.C.; de Sousa, R.A.; Cadore, S.; Barnes, R.M.Tatro, M.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2006**, *61*.
- 144. de Carvalho Magalhães, C.E.Arruda, M.A.Z.; Quim. Nova, 1998, 21.
- 145. Costa, L.C.S.M.; Neto, A.P.N.; Araújo, M.Q.; Melo, M.C.C.; Furtado, D.M.S.Kikuchi, A.N.S.; Food Additives & Contaminants: Part A, 2012, 29.
- 146. Fatma AYGUN, S.Gül ABANOZ, F.; Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2011, 17.
- 147. Bilandžić, N.; Đokić, M.Sedak, M.; Food Chem., 2011, 124.
- 148. Edmonds, J.Francesconi, K.; in *Organometallic compounSS in the environment*, John Wiley & Sons, Guildeford, 2003, ch. 195, pp. 195-222.
- 149. Narukawa, T.; Kuroiwa, T.; Narushima, I.Chiba, K.; Anal. Sci., 2008, 24, 355.
- 150. Entwisle, J.Hearn, R.; Spectrochim Acta, Part B, 2006, 61, 438.
- 151. Narukawa, T.; Kuroiwa, T.; Inagaki, K.; Takatsu, A.Chiba, K.; Appl. Organomet. Chem., 2005, 19, 239.
- 152. Narukawa, T.; Kuroiwa, T.; Yarita, T.Chiba, K.; Appl. Organomet. Chem., 2006, 20, 565.
- 153. Šlejkovec, Z.; van Elteren, J.T.Woroniecka, U.D.; Anal. Chim. Acta, 2001, 443, 277.
- 154. Goessler, W.Pavkov, M.; Analyst, 2003, 128, 796.
- 155. Vale, M.G.R.; Oleszczuk, N.Santos, W.N.; Appl Spectrosc Rev, 2006, 41, 377.
- 156. Nomura, C.S.; Silva, C.S.d.Oliveira, P.V.; Quim. Nova, 2008, 31.
- 157. Krug, F.J.; VI Workshop de preparo de amostras, Métodos de prepare de amostras, 6º edição, UFSM, abril de 2006.
- 158. Damin, I.C.; Silva, M.M.; Vale, M.G.R.Welz, B.; Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2007, 62.
- 159. Lücker, E.; Gerbig, C.Kreuzer, W.; Fresenius' journal of analytical chemistry, 1993, 346, 1062-1067

- 160. Lücker, E.; Meuthen, J.Kreuzer, W.; Fresenius' journal of analytical chemistry, 1993, 346, 1068-1071
- 161. Lücker, E.; Rosopulo, A.Kreuzer, W.; Fresenius' journal of analytical chemistry, 1987, 328.
- 162. Lücker, E.; J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14, 1731-1735
- 163. Lücker, E.; J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14. 583-587
- 164. Lücker, E.Schuierer, O.; Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 1996, 51.
- 165. Nomura, C.S.Oliveira, P.V.; Quim. Nova, 2006, 29.
- 166. Zmozinski, A.V.; Passos, L.D.; Damin, I.C.; Santo, M.A.B.E.; Vale, M.G.Silva, M.M.; *Analytical Methods*, **2013**, *5*.
- 167. Ribeiro, A.S.; Vieira, M.A.; da Silva, A.F.; Borges, D.L.G.; Welz, B.; Heitmann, U.Curtius, A.J.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2005**, *60*.
- 168. Cal-Prieto, M.; Felipe-Sotelo, M.; Carlosena, A.; Andrade, J.; López-Mahia, P.; Muniategui, S.Prada, D.; *Talanta*, **2002**, *56*.
- 169. Krug, F.J.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, P.V.; Apostila de Espectrometria de Absorção Atômica, Parte 2. Atomização eletrotérmica em forno de grafite, maio de 2007.
- 170. Welz, B.; Schlemmer, G.Mudakavi, J.R.; J. Anal. At. Spectrom., 1992, 7.
- 171. Ortner, H.; Bulska, E.; Rohr, U.; Schlemmer, G.; Weinbruch, S.Welz, B.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2002**, *57*.
- 172. Froes, R.E.S.; Carvalhinho, C.da Silva, J.B.B.; Revista Analytica. Junho/Julho, 2006.
- 173. Borges, D.; Curtius, A.; Welz, B.Heitmann, U.; Revista Analytica, 2005, 18.
- 174. Silva, M.M.; Damin, I.C.; Vale, M.G.R.Welz, B.; Talanta, 2007, 71.
- 175. Método para análise de arsênio por HG AAS, Nº 400/01, emissão 2010, Laboratório Nacional Agropecuário LANAGRO/RS, Laboratório de Metais, Traços e Contaminantes, Método de Ensaio MET, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento, Brasil.
- 176. Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; López-Sánchez, J.F.; Centrich, F.Rubio, R.; *Pure Appl. Chem.*, **2012**, *84*, 225.
- 177. Llorente-Mirandes, T.; Ruiz-Chancho, M.J.; Barbero, M.; Rubio, R.López-Sánchez, J.F.; *Chemosphere*, **2010**, *81*, 867.
- 178. Schlemmer, G.Welz, B.; Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 1986, 41.
- 179. Štupar, J.Dolinšek, F.; Acta Chim. Slov, 2004, 51.

- 180. Duarte, A.T.; Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.Welz, B.; Analytical Methods, 2013, 5.
- 181. de Jesus, A.; Zmozinski, A.V.; Damin, I.C.F.; Silva, M.M.Vale, M.G.R.; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2012**, *71*.
- 182. Belarra, M.; Resano, M.; Vanhaecke, F.Moens, L.; TrAC, Trends Anal. Chem., 2002, 21.
- 183. Coşkun, N.Akman, S.; Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2005, 60.
- 184. Deaker, M.Maher, W.; J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14, 1193.
- 185. Larsen, E.H.; J. Anal. At. Spectrom., 1991, 6, 375.
- 186. Slaveykova, V.I.; Rastegar, F.Leroy, M.J.; J. Anal. At. Spectrom., 1996, 11, 997.
- 187. Giacomelli, M.B.l.O.; Lima, M.C.; Stupp, V.; de Carvalho Júnior, R.M.; Borba da Silva, J.B.Barrera, P.B.; *Spectrochim Acta, Part B*, **2002**, *57*, 2151.
- 188. DOQ CGCRE 008 Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, INMETRO, 2007.
- 189. Oleszczuk, N.; Desenvolvimento de métodos analíticos de rotina para análise de grãos de café verde utilizando amostragem sólida por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2008.
- 190. Herber, R.Stoeppler, M.; *Trace element analysis in biological specimens*; Elsevier Science: Amsterdam, 1994.
- 191. International Measurement Evaluation Programme IMEP-30: Total arsenic, cadmium, lead and mercury, as well as methylmercury and inorganic arsenic in seafood (2010).
- 192. International Measurement Evaluation Programme IMEP-109: Total arsenic, cadmium, lead and mercury, as well as methylmercury and inorganic arsenic in seafood (2010).
- 193. Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; Centrich, F.; Rubio, R.López-Sánchez, J.F.; Food Chem., **2014**, 147, 377.
- 194. Amayo, K.O.; Petursdottir, A.H.; Newcombe, C.; Gunnlaugsdottir, H.; Raab, A.; Krupp, E.M.Feldmann, J.r.; *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 3589.
- 195. Fontcuberta, M.; Calderon, J.; Villalbí, J.R.; Centrich, F.; Portaña, S.; Espelt, A.; Duran, J.Nebot, M.; J. Agric. Food. Chem., 2011, 59, 10013.
- 196. Sirot, V.; Guérin, T.; Volatier, J.L.Leblanc, J.C.; Sci. Total Environ., 2009, 407, 1875.
- 197. European Commission (2004). Report of experts participating in Task 3.2.11 "Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead, and mercury of the population of the EU Member States".
- 198. Kirby, J.; Maher, W.; Ellwood, M.Krikowa, F.; Aust. J. Chem., 2004, 57, 967.

199. Method 3200 - US Environmental Protection Agency (EPA) - Mercury Species Fractionation and Quantification by Microwave Assisted Extraction, Selective Solvent Extraction and/or Solid phase Extraction, http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/3200.pdf.

200. Fitzgerald, W.F.; Lamborg, C.H.Hammerschmidt, C.R.; Chem. Rev., 2007, 107, 641.

ANEXOS

Analytical Methods

RSCPublishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Cite this: Anal. Methods, 2013, 5, 6416

Determination of cadmium and lead in fresh fish samples by direct sampling electrothermal atomic absorption spectrometry

Ariane V. Zmozinski,^a Leonardo D. Passos,^a Isabel C. F. Damin,^b Maria Aparecida B. Espírito Santo,^b Maria G. R. Vale^{ac} and Márcia M. Silva*ac

The determination of cadmium and lead in fish samples has large analytical interest due to the potential toxicity of these elements. The development of fast and reliable analytical methods is extremely important for an effective control of contamination. In this work, the feasibility of Cd and Pb determination in fresh fish samples using direct sampling by electrothermal atomic absorption spectrometry (DS-ET AAS) was investigated. For optimization of the furnace temperature program, pyrolysis and atomization curves with TORT-2 and DORM-3 certified reference materials were carried out using chemical modifier (0.05% Pd + 0.03% Mg + 0.05% Triton X-100). The figures of merit obtained were: characteristic mass of 1.0 pg and 16 pg and limit of detection (LOD) of 0.2 μ g kg⁻¹ and 1.0 μ g kg⁻¹ for Cd and Pb, respectively, based on 8 mg of sample mass. The results obtained for certificated references materials were statistically not different from the certified values at 95% confidence level, using the calibration with aqueous standards, showing that this calibration method is suitable for this application. For assessment of the accuracy of the method, fresh fish samples were digested. The results obtained with direct determination of Cd and Pb in fresh fish samples and with microwave assisted acid digestion were statistically accordant. The developed method for analysis of fresh fish samples is accurate, simple, fast and suitable for routine application, avoiding digestion procedures or the drying/lyophilization and grinding procedures, usually used in DS analysis, reducing the preparation time, risk of contamination and costs.

Received 4th June 2013 Accepted 31st August 2013

DOI: 10.1039/c3ay40923f

www.rsc.org/methods

1. Introduction

The fish meat has a good combination of vitamins and minerals, is highly nutritious and has a high-quality protein and a low saturated fat when compared to other meats.¹ Its consumption reflects positively on population health because reduces the risk of coronary heart disease and cholesterol, helps in the blood pressure control and assists the fetal brain development.²,3

Fish can absorb metals through ingestion of suspended materials in water and food and adsorption on tissue and membrane surfaces.⁴ Since most of metals have bioaccumulative properties,⁵ even when present in sub-quantities, they may be potentially hazardous if the concentration of these

substances in the fish consumed exceeds the limits regulated by legislation.⁶

In Brazil the control of residue and contaminants in all kind of food supply is accomplished by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). The National Agricultural laboratories (LANAGRO) are part of MAPA and are recognized reference centres, acting in the development of analytical methods, as well as in the researches and monitoring programs of food contaminants.7 Lead and cadmium, due to their high potential toxicity,8 are among the substances controlled by MAPA. The maximum levels established by the Brazilian National Program for Residue and Contaminant Control (NPRCC) in fish are 0.30 mg kg⁻¹ for Pb and 0.10 mg kg⁻¹ for Cd.9 Same levels are established by European regulation 2006/ 1881/EC.10 Thus, the monitoring of these elements by using highly sensitive, fast and reliable analytical methods is extremely necessary for an effective control of contamination and to increase the sample throughput to allow the screening of contaminated area and corrective actions.

Recent reviews emphasize that the main techniques used for the determination of trace elements in biological samples are: flame atomic absorption spectrometry (F AAS), electrothermal

[°]Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, CP 15 003, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mmsilva@iq.ufrgs.br; Fax: +55 51 3308-7304; Tel: +55 51 3308-6278

^bMinistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil

^{&#}x27;Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq, INCT de Energia e Ambiente, UFBA, CEP 40170-115, Salvador, BA, Brazil

Paper

atomic absorption spectrometry (ET AAS), inductively coupled plasma optical-emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS).¹¹⁻¹³ The high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS AAS) emerges as a very promising technique in this scenario because it provides a great advantage for the direct sampling analysis (DS). The entire spectral environment of the analytical line becomes visible, enabling the detection of spectral interferences.¹⁴

In trace analysis, the integrity of chemical information is strongly dependent on the initial steps of the analytical method. Thus, an appropriate selection of the sample preparation procedure is essential. A recent review published by Korn *et al.*¹¹ summarizes the publications on sample preparation procedures for the determination of metals in foods by spectroanalytical techniques. Among the most frequently methods used in the preparation of food samples are the dry ashing and wet digestion, preferably with microwave assistance. Costa *et al.*¹⁵ recently investigated the use of microwave-assisted acid digestion for validation of an analytical method for the determination of cadmium in fish.

Slurry sampling and direct solid sampling analysis have been increasingly used; as reported,11 there is a trend towards the use of methods which avoid the intensive manipulation of the sample and minimize reagent consumption, thereby reducing the possibility of sample contamination and improving the analytical throughput. Some authors have developed methods for determination of metals in fish and biological materials utilizing slurry preparation.16,17 The slurry sampling, even being a simple and fast procedure, can affect the precision and accuracy of the analysis due to particle size and lack of homogeneity of the samples.18 According to Korn et al.11 direct analysis of solid samples is gaining importance in the field of food analysis as it offers the highest sensitivity, avoids the use of acids and other aggressive reagents, makes possible the analysis of micro-samples, and can be applied for fast screening analysis.

Of all the spectroscopic techniques, ET AAS is perhaps the most suited for the direct analysis of solid samples, since this technique allows in-atomizer thermal transformation of the sample and, with chemical modification assistance, the simplification of the matrix during the various stages of the electrothermal program. Moreover the direct sampling electrothermal atomic absorption spectrometry (DS-ET AAS) allows calibration against aqueous standards and the utilization of permanent chemical modifiers.19 Despite of all this advantages and facilities, direct analysis of biological samples, due to its complexity, requires careful investigation of the interferences with CRMs or conventional methods, as acid digestion. 12 Besides, the sample preparation of biological tissues for DS analyses frequently includes homogenization and lyophilization. Korn et al.11 stated that there are few publications on direct sampling of fresh tissues. Based on the best of our knowledge, the use of direct sampling for fresh fish samples analysis has not been published yet.

The goal of this work was the development of a simple, fast, and accurate analytical method based on DS-ET AAS, which can be applied routinely in determination of Pb and Cd in fresh fish samples within the scope of the Brazilian program of residue and contaminant control in products of animal origin. The samples were weighed directly onto the solid sampling platforms and introduced into the graphite tube for analysis. The accuracy of the method has been investigated using certified reference materials and a comparison with the microwave-assisted acid digestion.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

All measurements were carried out using in an AAS Zeenit 650P (Analytik Jena AG, Germany) and background correction by Zeeman effect (0.8 T). Analytik Jena hollow cathode lamps of Pb and Cd were used as the radiation sources with a lamp current of 3.0 and 2.5 mA, respectively. The analytical lines at 283.3 and 228.8 nm with a spectral bandpass of 0.5 and 0.8 nm for Pb and Cd, respectively, were used. All experiments were carried out using graphite solid sampling platforms (Analytik Jena Part no. 407-152.023) and graphite solid sampling tubes without a dosing hole (Analytik Jena Part no. 407-A81.303). The sample mass was transmitted to the instrument's computer to calculate the 'normalized integrated absorbance' (integrated absorbance calculated for 1.0 mg of the sample) after each measurement. The aqueous standards, modifier solution and digested samples were injected manually onto the solid sampling platforms using a micropipette. An M2P microbalance (Sartorius, Göttingen, Germany) with an accuracy of 0.001 mg was used for weighing the samples directly onto the solid sampling platforms. Argon with a purity of 99.996% (White Martins, São Paulo, Brazil) was used as purge gas. The flow rate was kept at 2.0 L min⁻¹ during all stages, except in the atomization, when the argon flow rate was stopped. Integrated absorbance (peak area) was used exclusively for signal evaluation and quantification. The optimum parameters for the electrothermal temperature program for both elements are given in Table 1.

The fish muscle samples were lyophilized in a lyophilizer ModulyonD Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation, USA) and milled in a micro-mill A 11 Basic (IKA – Werke, Germany). A microwave Top Wave (Analytik Jena AG, Jena, Germany) was used for digesting the samples.

Table 1 Electrothermal temperature program for the determination of Pb and Cd in fish samples

Stage	Temperature/°C	Ramp/ °C s ⁻¹	Hold time/s
Drying 1	110	15	20
Drying 2	150	20	45
Pyrolysis	$800^a/1100^b$	300	35
Atomization	$1700^a/2200^b$	FP^c	6
Cleaning	2400	1000	6

^a Cadmium. ^b Lead. ^c FP: full power.

2.2. Reagents, solutions and samples

Analytical grade reagents were used exclusively. Deionized water with a specific resistivity of 18 M Ω cm⁻¹ from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used for the preparation of standards, modifier solutions and digestions. All containers and glassware were soaked in 3 mol L⁻¹ nitric acid for at least 24 h and rinsed three times with water before use. The nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) used for the preparation of standards, modifier solutions and digestions was further purified by sub-boiling distillation in a quartz sub-boiling still (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Germany). Lead and cadmium stock solutions (1000 mg L^{-1}) were prepared from Titrisol concentrates (Merck, Germany). The working standards were prepared by serial dilution of the stock solutions with the addition of 0.014 mol ${\it L}^{-1}$ nitric acid (Merck, Germany). The chemical modifier utilized was 0.05% (m/v) Pd + 0.03% (m/v) Mg + 0.05% (v/v) Triton X-100 (Pd, Mg as the nitrates from Merck, Germany, and Triton X-100 from Union Carbide). The following reagents were used for sample digestion: 30% (v/v) H₂O₂ and purified HNO₃ (both from Merck, Germany).

2.3. Reference materials and samples

The following certified reference materials (CRM) were used in this work for method development and validation: DORM-3 (Fish Protein, NRC, Canada), TORT-2 (Lobster Hepatopancreas, NRC, Canada), NIST SRM 2976 Mussel Tissue and NIST SRM 1566b Oyster Tissue (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). The reference materials (RM) 9th PT on fish (CRL-ISS, Italy) was also used. Six fresh fish muscle samples of different kind of fishes (Hake, Snapper, Whitefish, Tuna) were provided by the Laboratory of Trace Metals and Contaminants (LANAGRO/RS) from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA/Brazil). These samples were initially washed with Milli-Q water, cut, and homogenized using a blender (non-contaminating kitchen mixer). They were analyzed immediately or frozen at -10 °C in cleaned plastic bags and defrosted naturally just before the analysis.

2.4. CRM and lyophilized samples

In order to compare the results, the fresh fish muscle samples were lyophilized for a period of 5 hours. After this procedure, the lyophilized samples were ground in vibratory mill and sieved through polyester mesh of 85 μm to improve the particle size distribution. The part of the sample that not passed through the sieve was ground again, until all lyophilized of sample has been sieved. Before analysis the samples were dried in oven at 50 $^{\circ} C$ until a constant weight, in order to eliminate some possibly absorbed humidity.

The mass sample (0.5 to 3.0 mg) was weighed directly on the platform, and then 10 μL of chemical modifier was added over the sample. The platform was introduced into the graphite tube by DS-ET AAS for determination of lead and cadmium.

2.5. Direct analysis of fresh fish samples

Because of the continuously decreasing on mass values for fresh fish samples during the weighing, due to the loss of humidity, the strategy used to weigh the samples was to keep the first weight, disregarding the loss of weight with time. 21 Aliquots between 2 and 8 mg, depending on the analyte concentration, were weighed directly onto the solid sampling platforms, and $10\,\mu\text{L}$ of chemical modifier was added over the sample, and then the platform was transferred to the graphite tube. Each sample was weighed and analyzed at least 10 times. The total time of analysis for each sample was 20 minutes, considering the number of measurements of each sample.

2.6. Microwave-assisted digestion

In order to assess the accuracy of the obtained results, a microwave-assisted wet digestion in closed PTFE reactors, based on Lavilla et al.20 work, was carried out. Initially, 250 mg of lyophilized fish samples, 6 mL of HNO₃ (65% v/v) and 2 mL of H₂O₂ (30% v/v) were added in the PTFE reactors. Then, the reactor were closed, placed inside the microwave and heated by the following program: temperature of 200 °C, pressure of 40 bar, 90% of power, ramp of 15 minutes and heating time of 40 minutes. After cooling to environment temperature, the digested samples were diluted to a final volume of 25 mL with ultrapure water. In order to attest the accuracy of the digestion method, certified reference materials of fish protein (DORM-3) and lobster hepatopancreas (TORT-2) were digested and analyzed for corresponding elements. The samples and CRM were digested in duplicate. The total time of digestion was approximately 3 hours (including weighting and cooling times).

The digested samples were analyzed injecting $20~\mu L$ of samples manually onto the solid sampling platforms using a micropipette and running the same temperature program used for direct sampling (Table 1).

3. Results and discussion

3.1. Wavelength selection

Firstly, due to low concentrations of lead in fish samples, the use of primary resonance line for lead (217.0 nm), was investigated with fresh fish samples and certified reference material. Despite of the higher sensitivity of this line, the instrumental limit of detection (LOD) were higher than the alternative line of 283.3 nm. According to Welz and Sperling,²² the 217.0 nm line does not give a better LOD owing to a poorer S/N ratio. In addition, more pronounced background absorption effects occur in 217.0 nm. Thus, the alternative line (283.3 nm) was chosen. In the case of cadmium the primary analytical line at 228.8 nm was used due to the significantly higher sensitivity and good S/N ratio. In this way, it was possible to analyze lower sample mass and no significant spectral interference was observed when a pyrolysis temperature higher than 700 °C was used.

3.2. Modifiers and temperature program

The heating program (Table 1) was optimized for the direct determination of Pb and Cd in fresh fish samples using the CRMs TORT-2 (Lobster hepatopancreas) and DORM-3 (Fish Protein). This study was started with Pb and the TORT-2 was found to be appropriated for that, but this CRM could not be used for cadmium optimization due to the high concentration of this element. Of course, a less sensitive line could be used, but as the Cd concentration in the samples are very low, DORM-3 was found to be more appropriate for that. Two drying temperatures with slow ramp rates and long hold times were utilized due to the high water content of fresh fish samples, as shown in Table 1. Also, this was necessary to perform a homogenous heating and thus preventing the overflow and splash of chemical modifier.

Ortner et al.²³ summarized in their review several modifiers and coatings for electrothermal atomic absorption spectrometry and their mechanisms of action. In this work, a mixture of palladium and magnesium was investigated as a chemical modifier. It was proposed by Schlemmer and Welz²⁴ and is considered a kind of a universally applicable chemical modifier for a wide variety of samples and analytes. The chemical modifier was pipetted over the sample immediately after the sample weighing step. The addition of Triton X-100, as dispersing agent, improves the contact between sample and modifier.²¹

A preliminary study of the amount of modifier was performed in order to find the optimum mass that stabilizes thermally Pb and Cd. Volumes between 5 and 20 μL (corresponding to 2.5 and 10 μg of Pd and 1.5 and 6 μg of Mg) with pyrolysis temperatures of 900 °C and 800 °C and atomization temperatures of 2100 °C and 1700 °C for Pb and Cd, respectively, were investigated. The analytical signal showed no significant variation in the integrated absorbance values for Cd and Pb in aqueous standards for all masses of modifier tested. However, the highest analytical signal for the maximum amount of sample was obtained with at least 10 μL (5 μg of Pd

and 3 μg of Mg) for Cd and Pb in DORM-3 and TORT-2 CRMs, respectively, probably due to the better distribution and interaction between the modifier and sample in this condition. Therefore, 10 μL of modifier, with the composition of 5 μg Pd + 3 μg Mg + 0.05% (v/v) Triton X-100, were used in further optimization studies for both analytes.

Pyrolysis curves obtained for CRMs (TORT-2 for Pb and DORM-3 for Cd) and for 0.5 ng of Pb and 50 pg of Cd in aqueous standards, with Pd/Mg modifier, are shown in Fig. 1. The Cd signals achieved with a standard solution and with the CRM are comparable, while for Pb the signals are lower for CRM. This fact is due to the different amount of Pb introduced in the DS-ET AAS. For the CRMs, reliable measurement of analyte signals was only possible with pyrolysis temperatures higher than 600 °C for Cd and 700 °C for Pb due to high changes in background signal, occasioned by the incomplete elimination of the matrix causing smoke generation during the atomization step, resulting in the scattering of radiation.25 For this reason, the use of chemical modifier became mandatory in order to increase the pyrolysis temperature and reduce the background absorption signal. The pyrolysis temperatures of 1100 °C and 800 °C for Pb and Cd, respectively, were chosen and used in all further experiments.

Peak shapes and background absorption were also considered when choosing the proper furnace conditions for Pb and Cd. Typical atomization and background signals are shown in Fig. 2. Even though the signal for Pb was lower, due to the lower amount of analyte introduced with the sample into the atomizer, it can be seen that the peak shape of Cd and Pb in CRMs and fresh fish samples is similar to that obtained from an aqueous standard, suggesting that a straightforward calibration is possible. An atomization temperature of 2200 °C for Pb and 1700 °C for Cd was chosen on the basis of the obtained sensitivity and peak shape for both analytes. The complete furnace temperature program is shown in Table 1.

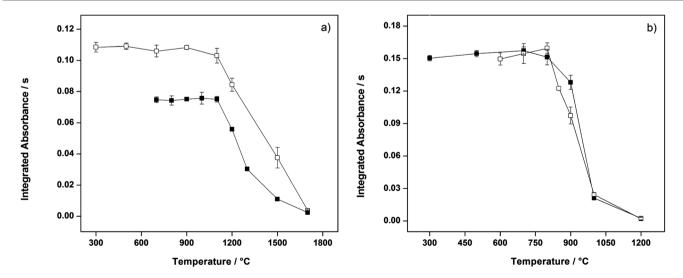


Fig. 1 Pyrolysis curves using DS-ET AAS for: (a) Pb in standard solution (open square) and in CRM Tort-2 (closed square), atomization temperature = $2100 \,^{\circ}$ C; (b) Cd in standard solution (closed square) and in CRM Dorm-3 (open square), atomization temperature = $1900 \,^{\circ}$ C. The data for the CRM curves are in 'normalized integrated absorbance' (integrated absorbance calculated for 1 mg and 0.2 mg of the CRMs for Pb and Cd, respectively). Chemical modifier: $5 \,\mu g \, Pd + 3 \,\mu g \, Mg + 0.05\%$ (v/v) Triton X-100. Error bars refer to the SD of 3 and 6 consecutive measurements of the standards and CRMs, respectively.

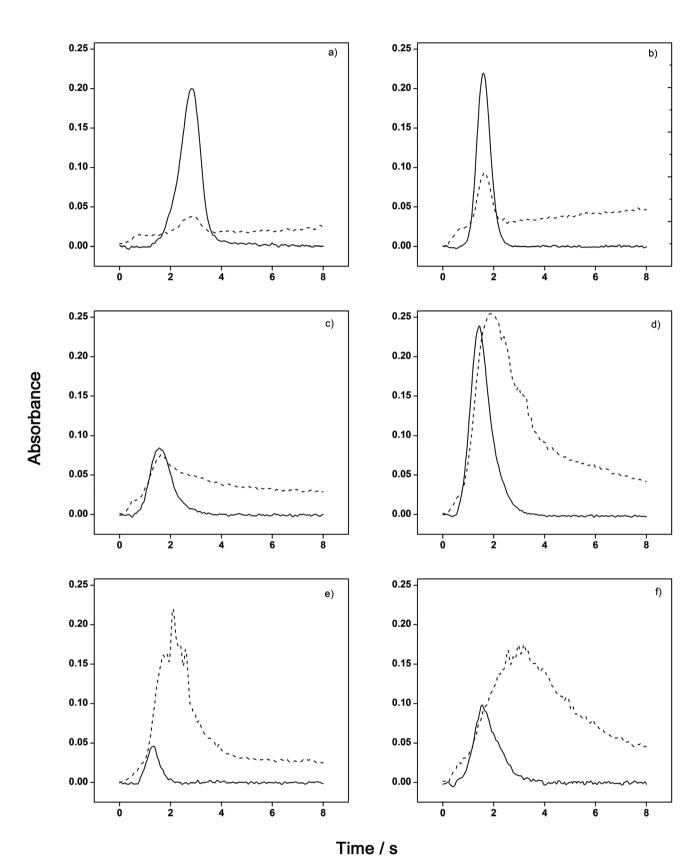


Fig. 2 Absorbance signals for Pb (a, c and e) and Cd (b, d and f) using DS-ET AAS. Full lines represent the atomic absorption (AA) and broken lines represent the background (BG) signals. (a) 1 ng Pb in aqueous standard; (b) 50 pg Cd in aqueous standard; (c) TORT-2; (d) DORM-3, (e) 2.5 mg of M2 fresh fish sample and (f) 3.6 mg of M2 fresh fish sample. The temperature programs are given in Table 1. Chemical modifier: 5 µg Pd + 3 µg Mg + 0.05% (v/v) Triton X-100.

Paper

Table 2 Relative standard deviation for the normalized integrated absorbance for Pb and Cd in fresh and lyophilised fish samples

		Fresh fish samples			Lyophilised f	fish samples			
Analyte	Sample	Mass range sampled/mg	Normalized absorbance a	RSD/% $(n = 10)$	Mass range sampled/mg	Normalized absorbance a	RSD/% $(n = 6)$		
Pb	M1	2.0-5.0	0.016	13	0.8-3.0	0.030	4		
	M2	2.0-8.0	0.012	20	1.5-3.0	0.020	9		
	M3	2.0-4.8	0.020	13	0.8-1.7	0.034	6		
Cd	M1	2.0-4.5	0.084	9	0.5-2.0	0.140	7		
	M2	2.0-4.3	0.080	10	0.5 - 2.2	0.120	6		
	M3	2.0-4.7	0.090	11	1.0 - 2.0	0.144	6		

^a The absorbance signals were normalized for 2 mg of sample.

3.3. Sample mass and sampling uncertainty

Some authors,26 related some difficulties of solid sampling as microweighing sample, inhomogeneity problems, sample introduction difficulties, and limited sample size. Furthermore, CoYkun and Akman²⁷ reported that if the sample mass cannot be kept constant, there might be some errors due to the use of different masses of sample.

In this work the range of sample mass of fresh fish samples that can be analysed and sampling errors were investigated. In order to evaluate the weighing errors, part of the fresh fish samples was lyophilised, grounded and dried as described in the Section 2.4. The fresh fish samples investigated were found to contain an average value of 38 \pm 2% of moisture content. The concentration of Cd and Pb for the lyophilised samples was corrected for this water loss in order to facilitate comparison with the values found when the fresh samples were analyzed. The fresh fish samples were homogenized before the analysis as described in the Experimental section. Immediately after the homogenization a portion of the sample was transferred to a cleaned small bag, all air was removed from the bag and it was tightly closed. The bag was opened only in the moment of weighing for analysis. This procedure reduced the risk of losses of moisture content before weighing. The procedure of weighing fresh samples was to record the first weight, not considering the weight loss with time, as proposed by Lücker and Schuierer.28

The sample mass was varied between 2 and 8 mg for fresh fish samples and between 0.5 and 3 mg, for lyophilised fish samples, as shown in Table 2. It should be stressed that 8 mg is the maximum amount of sample that can be weighed on the platform and the lower mass used for lyophilised samples was due to the higher concentration obtained in this condition. The relative standard deviation (RSD) values for the normalized

integrated absorbance for Cd and Pb in three samples are shown in Table 2. For both analytes, the mean RSD were approximately 13% for fresh fish and approximately 6% for lyophilised or fish, which is in agreement with the values reported in the literature for fresh meat,21 fresh avian kidney29 and direct solid sampling analysis of lyophilised or dried samples. A higher RSD (20%) found for Pb in M2 was probably due to the lower absorbance and higher background signal (see Fig. 2e) as a significantly larger amount of sample had to be introduced, owing the lower concentration of Pb in this sample. However, as can be seen from the results for Cd, with masses around 2-4 mg, the RSD is highly acceptable (9-11%), being similar to the RSD obtained for digestion procedures. In a previous work with fresh meat²¹ it was stated that the lower RSD was found when working with sample masses between 1 and 3 mg of samples. Lower masses (around 1 mg) could not be investigated in this work since all samples analyzed presented very low concentration of Cd and Pb, considerably lower than the threshold limit. Thus, it could be expected that lower RSD can be achieved when the Cd and Pb contents are near to the maximum acceptable concentrations. The RSD values found in this work was considered acceptable considering the complexity of the biological matrix and the direct analysis of fresh samples, which avoids manipulation of the samples, such as lyophilization, grinding and sieving procedures, that normally are used in direct solid sampling analysis, or digestion procedures for conventional analysis. It should be stressed that all this steps might result in a higher final uncertainty in the analysis.

The correlation between sample mass and integrated absorbance was evaluated using TORT-2 for Pb, DORM-3 for Cd, the fresh fish sample M2, and the conditions optimized above. The sample mass has been varied between 0.1 and 8.0 mg. The correlation coefficients, based on 20 points for each curve, were: 0.9850 (sample mass up to 3 mg for TORT-2) and 0.9612 (sample

Table 3 Analytical figures of merit obtained for the determination of lead and cadmium using DS-ET AAS

Analyte	Linear regression equation	R	m_0 pg	$LOD^{a} (n = 10) \text{ mg kg}^{-1}$	$LOQ^{a} (n = 10) \text{ mg kg}^{-1}$
Pb	A = -0.00401 + 0.223m (ng)	0.9971	16	0.001	0.003
Cd	A = 0.00248 + 0.00273m (pg)	0.9991	1.0	0.0002	0.0006

^a Based on 'zero mass response' technique and calculated for the 8 mg of sample.

Table 4 Determination of Pb and Cd in certificate reference materials using direct solid sampling (DS) and acid digestion by ET AAS

	Concentration of Cd $mg^{-1} kg^{-1}$ (mean \pm SD)			Concentration of Pb $mg^{-1} kg^{-1}$ (mean \pm SD)			
Sample	Certified value	DS (n = 6)	Digestion $(n = 3)$	Certified value	DS (n = 6)	Digestion $(n = 3)$	
TORT-2	_	_	_	0.350 ± 0.130	0.342 ± 0.010	0.370 ± 0.020	
SRM 2976	0.820 ± 0.160	0.812 ± 0.022	_	1.190 ± 0.180	1.191 ± 0.076	_	
SRM 1566b	_	_	_	0.308 ± 0.009	0.301 ± 0.017	_	
DORM-3	0.290 ± 0.020	0.288 ± 0.013	0.293 ± 0.003	0.395 ± 0.005	0.392 ± 0.014	0.397 ± 0.015	
9 th PT	0.314 ± 0.090^a	0.309 ± 0.013	_	_	_	_	

mass up to 8 mg for fresh fish M2) for Pb; 0.9843 (sample mass up to 2.1 mg for DORM-3) and 0.9770 (sample mass up to 5.0 mg for M2) for Cd.

3.4. Figures of merit

Several studies have shown that calibration against aqueous standards is feasible in DS-ET AAS after careful program optimization. ¹⁹ In this work, calibration using aqueous standards was checked against results obtained for CRM as will be shown in Section 3.5. Calibration curves were established using a blank and five calibration solutions in the concentration range of 5–100 μ g L⁻¹ (0.05–1.0 ng) for Pb and 1–8 μ g L⁻¹ (10–80 pg) for Cd.

The figures of merit obtained for Pb and Cd by DS-ET AAS are shown in Table 3. The characteristic mass (m_0) values based on aqueous standard obtained for lead and cadmium by DS-ET AAS are in good agreement with those reported in the literature.22 The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), defined as the analyte signal corresponding to an integrated absorbance signal equal to three times and ten times the standard deviation of the blank, respectively, are also shown in Table 3. The blank measurements were carried out according to the 'zero mass response' technique³⁰ introducing repeatedly a solid sampling platform, containing only the modifier, followed by a regular atomization cycle. The LOD and LOQ, calculated for the maximum mass of sample that can be analysed (8 mg), are better than the values found in the literature for both analytes.21 This fact can be attributed to the worst S/N ratio of deuterium corrector used in the previous work.21 Additionally, the LOD and LOQ found in this work are

comfortably lower than the maximum levels of 0.30 for lead and 0.10 mg kg^{-1} for cadmium in fish, established by the NPRCC. The analysis of the calibration plots showed good linear R coefficients. The lifetime of the graphite tubes and graphite platforms was around 500 and 250 heating cycles, respectively, for both elements.

3.5. Analytical results

The feasibility of using calibration against aqueous standards for DS-ET AAS was investigated by the determination of Cd and Pb in one fish RM and several CRMs of fish and of other similar materials such as sea fruits. Two CRMs were also digested in order to investigate the accuracy of the digestion method adopted for validation of the results of fresh fish analysis. The results obtained for CRMs are shown in Table 4. The Student's t-test was applied for each result obtained by direct solid sampling and the corresponding certified value and also for each result obtained by acid digestion related to the certified values. No significant difference was found at the 95% confidence level. The good agreement of these results guarantees the possibility of using aqueous standards for the determination of Cd and Pb in fresh fish samples using the proposed method and the accuracy of the digestion method adopted.

In order to verify the accuracy of the results for fresh fish samples, a comparison of methods was performed. Firstly, DS-ET AAS was used to analyze the dried and milled samples as it is known that this technique is well suited for this determination, as shown by the results in Table 4 and in the literature. ¹⁹ In order to compare the results with those obtained for fresh fish

Table 5 Analytical results obtained by DS-ET AAS for Cd and Pb in fresh and lyophilised samples and ET AAS for Cd and Pb in digested fish samples

Concentration of Cd mg $^{-1}$ kg $^{-1}$ FS a (mean \pm			Concentration of Cd $\mathrm{mg}^{-1} \mathrm{kg}^{-1} \mathrm{FS}^a$ (mean $\pm \mathrm{SD}$)			Concentration of Pb $\mathrm{mg}^{-1}\ \mathrm{kg}^{-1}\ \mathrm{FS}^a\ (\mathrm{mean} \pm \mathrm{SD})$			
Sample	Fresh $(n = 10)$	Lyophilised $(n = 6)$	Digestion $(n = 3)$	Fresh $(n = 10)$	Lyophilised $(n = 6)$	Digestion $(n = 3)$			
M1	0.0130 ± 0.0012	0.0125 ± 0.0013	0.0122 ± 0.0015	0.0265 ± 0.0035	0.0246 ± 0.0015	0.0241 ± 0.0012			
M2	0.0116 ± 0.0012	0.0115 ± 0.0010	0.0110 ± 0.0002	0.0168 ± 0.0034	0.0158 ± 0.0022	0.0168 ± 0.0019			
M3	0.0121 ± 0.0013	0.0124 ± 0.0011	0.0110 ± 0.0005	0.0242 ± 0.0031	0.0247 ± 0.0025	0.0247 ± 0.0034			
M4	0.0093 ± 0.0010	0.0088 ± 0.0006	_	0.0209 ± 0.0019	0.0209 ± 0.0028	_			
M5	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>_</td><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	_	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>_</td></loq<>	_			
M6	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>_</td><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	_	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>_</td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>_</td></loq<>	_			

^a All values based on wet weight (mg per kg of the fresh).

samples, the concentrations obtained to the lyophilised samples were corrected to wet weight, as described earlier. Secondly, a microwave assisted acid digestion was also used to validate the proposed method. The results obtained for Pb and Cd in the fish samples are summarized in Table 5. Concentrations of Cd, and Pb obtained for all samples were far below the established values by NPRCC⁹ and the European Community regulations.¹⁰

The Analysis of Variance (ANOVA) was applied to the data of the three methods shown in Table 5 for samples M1, M2 and M3. The calculated F-values for Cd (M1 = 1.294; M2 = 0.079; M3 = 1.968) and for Pb (M1 = 0.771; M2 = 1.346; M3 = 0.554) were lower than the F-critical obtained for both elements (3.806), showing that the results are not significantly different at the 95% confidence level.

The use of fresh fish samples avoided the drying, lyophilization and grinding procedures, reducing the preparation time, risk of contamination and analysis cost. The proposed method using fresh fish samples provides accurate results that are in agreement with alternative methods, making this procedure highly suitable for routine application.

4. Conclusion

In this work, an accurate determination of lead and cadmium in fresh fish samples was developed. This very sensitive and rapid determination, which uses aqueous standards for calibration, a conventional Pd/Mg modifier and only a simple homogenization step, makes this procedure highly suitable for routine application. The digestion procedure or the grinding and drying/lyophilisation pre-treatment, generally adopted by microanalysis in ET AAS, are not needed which is another advantage. This study has shown that direct analysis of fresh fish by ET AAS can be applied as a rapid screening procedure, giving support for an effective control of contamination. Obviously, for a screening analysis there is no need to detect the lowest analyte concentrations or to determine excessively high analyte concentrations with high accuracy. A screening method has to be able to detect outliers reliably, i.e. it has to work with good accuracy and reasonable precision in the vicinity of the threshold limit. It might be expected that this technique could be extended to the determination of other trace elements in fish and fish products.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPERGS (Process number 1014001) for the financial support. A.V.Z. has scholarships from CAPES and L.D.P., M.M.S. and M.G.R.V. have scholarships from CNPq. We also thank Dr Bernhard Welz for his collaboration in the digestion procedure.

References

- 1 B. Ersoy and A. Özeren, Food Chem., 2009, 115, 419-422.
- 2 S. M. Innis, J. Nutr., 2007, 137, 855-859.

- 3 J. H. Lee, J. H. O'Keefe, C. J. Lavie and W. S. Harris, *Nat. Rev. Cardiol.*, 2009, **6**, 753–758.
- 4 M. G. M. Alam, A. Tanaka, G. Allinson, L. J. B. Laurenson, F. Stagnitti and E. T. Snowa, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2002, 53, 348–354.
- 5 D. Mendil, O. D. Uluozlu, E. Hasdemir, M. Tuzen, H. Sari and M. Suicmez, *Food Chem.*, 2005, **90**, 175–179.
- 6 ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012, Brasília. Available from: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=90&word; accessed 10th June 2012.
- 7 A. Q. Mauricio and E. S. Lins, *Food Addit. Contam., Part A*, 2012, **29**, 482–489.
- 8 G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg and L. Friberg, in *Handbook on the Toxicology of Metals*, ed. G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg and L. Friberg, Academic Press, San Diego, 3rd edn, 2007, ch. 7, pp. 117–145.
- 9 NPRCC: National Program for Residue and Contaminant Control 2012. Normative Instruction no. 11, Brasília, May 2012. Available from: http://www.agricultura.gov.br/ arq_editor/IN%2011-%202012.pdf; accessed 10th June 2012.
- 10 European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Brussels, Belgium.
- 11 M. D. A. Korn, E. S. D. Morte, D. C. M. B. dos Santos, J. T. Castro, J. T. P. Barbosa, A. P. Teixeira, A. P. Fernandes, B. Welz, W. P. C. dos Santos, E. B. G. N. dos Santos and M. Korn, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2008, 43, 67–92.
- 12 J. Sardans, F. Montes and J. Peñuelas, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2010, **65**, 97–112.
- 13 A. Taylor, M. P. Day, M. Patriarca and M. Whitee, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 537–576.
- 14 B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek and U. Heitmann, in *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH, Weinheim, 1st edn, 2005, ch. 4, pp. 57–74.
- 15 L. C. Costa, A. P. Neto, M. Q. Araújo, M. C. Melo, D. M. Furtado and A. N. Kikuchi, Food Addit. Contam., Part A, 2012, 29, 633-640.
- 16 R. A. Bugallo, S. R. Segade and E. F. Gómez, *Talanta*, 2007, 72, 60–65.
- 17 I. B. Karadjova, P. K. Petrov, I. Serafimovski, T. Stafilov and D. L. Tsalev, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 258–268.
- 18 G. Wibetoe, D. T. Takuwa, W. Lund and G. Sawula, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1999, **363**, 46–54.
- 19 M. G. R. Vale, N. Oleszczuk and W. N. L. dos Santos, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2006, 41, 377–400.
- 20 I. Lavilla, J. M. González-Costas and C. Bendicho, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **591**, 225–230.
- 21 I. C. F. Damin, M. M. Silva, M. G. R. Vale and B. Welz, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 1037–1045.
- 22 B. Welz and M. Sperling, in *Atomic absorption spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 3th edn, 1999, ch. 9, pp. 516–519.
- 23 H. M. Ortner, E. Bulska, U. Rohr, G. Schlemmer, S. Weinbruch and B. Welz, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2002, 57, 1835–1853.
- 24 G. Schlemmer and B. Welz, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1986, **41**, 1157–1165.

- 25 A. S. Ribeiro, M. A. Vieira, A. F. da Silva, D. L. G. Borges, B. Welz, U. Heitmann and A. J. Curtius, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2005, **60**, 693–698.
- 26 M. A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke and L. Moens, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2002, 21, 828–839.
- 27 N. CoYkun and S. Akman, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2005, **60**, 415–419.
- 28 E. Lücker and O. Schuierer, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1996, 51, 201–210.
- 29 E. Lücker, Fresenius' J. Anal. Chem., 1997, 358, 848-853.
- 30 U. Kurfurst, in *Solid Sample Analysis: Direct and Slurry Sampling using GF-AAS and ETV-ICP*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1st edn, 1998, ch. 2, pp. 21–127.

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Method development for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in seafood



Ariane V. Zmozinski ^a, Sergio Carneado ^b, Carmen Ibáñez-Palomino ^b, Àngels Sahuquillo ^b, Iosé Fermín López-Sánchez ^{b, *}. Márcia M. da Silva ^a

- ^a Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- ^b Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 24 March 2014 Received in revised form 30 May 2014 Accepted 31 May 2014 Available online 9 June 2014

Keywords:
Mercury speciation
Methylmercury
Inorganic mercury
Seafood
Certified reference materials (CRMs)
LC-UV-CV-AFS

ABSTRACT

This paper reports the method development for the simultaneous determination of methylmercury (MeHg $^+$) and inorganic mercury (iHg) species in seafood samples. The study focused on the extraction and quantification of MeHg $^+$ (the most toxic species) by liquid chromatography coupled to on-line UV irradiation and cold vapour atomic fluorescence spectroscopy (LC-UV-CV-AFS), using HCl 4 mol L $^{-1}$ as the extractant agent. Accuracy of the method has been verified by analysing three certified reference materials and different spiked samples. The values found for total Hg and MeHg $^+$ for the CRMs did not differ significantly from certified values at a 95% confidence level, and recoveries between 85% and 97% for MeHg $^+$, based on spikes, were achieved. The detection limits (LODs) obtained were 0.001 mg Hg kg $^{-1}$ for MeHg $^+$ and 0.0004 mg Hg kg $^{-1}$ for iHg. The quantification limits (LOQs) established were 0.003 mg Hg kg $^{-1}$ for total mercury, 0.0010 mg Hg kg $^{-1}$ for MeHg $^+$ and 0.0012 mg Hg kg $^{-1}$ for iHg. Precision for each mercury species was established, being \leq 12% in terms of RSD in all cases.

Finally, the developed method was applied to 24 seafood samples from different origins and total mercury contents. The concentrations for Total Hg, MeHg $^+$ and iHg ranged from 0.07 to 2.33, 0.003-2.23 and 0.006-0.085 mg Hg kg $^-$ 1, respectively. The established analytical method allows to obtain results for mercury speciation in less than 1 one hour including both, sample pretreatment and measuring step. © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Within the elements that are toxic for humans and the environment, mercury is a well-known pollutant due to the high toxicity of its species (Ibáñez-Palomino, López-Sánchez, & Sahuquillo, 2012a; Leopold, Foulkes, & Worsfold, 2010). All Hg forms are toxic, with the organic species being in most cases more dangerous than the inorganic ones (Gochfeld, 2003; Leopold et al., 2010). However, it is very important to identify which chemical form is more or less toxic, so as to evaluate its impact on environment and human health (Ibáñez-Palomino et al., 2012a). The akyl compounds of Hg are more toxic than the inorganic ones, particularly methylmercury (MeHg⁺), the most toxic species (Ibáñez-Palomino et al., 2012a; Leopold et al., 2010). MeHg⁺ bioaccumulates in the food chain, with its concentration higher in

some fish species than in the water environment (Leopold et al., 2010).

Bioaccumulation occurs in most cases of human exposure (Gochfeld, 2003). Seafood is responsible for the highest source of Hg, especially MeHg⁺ (Baer et al., 2011; Capar, Mindak, & Cheng, 2007). Concentrations higher than 10 mg kg⁻¹ of MeHg⁺ are found in the muscle of some fish species (Von Burg & Greenwood, 1991). The consumption of fish located at the top of the food chain is not recommended for pregnant women, due to the potential risk of MeHg⁺ contamination (Baer et al., 2011; EFSA, 2004). As a consequence of MeHg⁺ exposure, neurological problems in adults and blindness and mental retardation in infants were reported in the victims of Minamata disease (Gochfeld, 2003). Other countries, such as Iraq, Guatemala and Brazil, also had serious problems with exposure to organic mercury (Amin-Zaki et al., 1974; Dolbec, Mergler, Sousa Passos, Sousa de Morais, & Lebel, 2000; Gochfeld, 2003; Storelli, Busco, & Marcotrigiano, 2005).

The Codex Stan 193-1995, organized by the FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) and WHO (World

^{*} Corresponding author.

E-mail address: fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

Health Organization), stipulates the maximum levels of methylmercury in fish and predatory fish (0.5 and 1 mg kg $^{-1}$, respectively) (CODEX STAN 193-1995, 2009). The Codex indicates the maximum level for toxicants permitted in food trade internationally (CODEX STAN 193-1995, 2009). The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) proposed a provisional tolerable weekly intake for MeHg $^+$ of 1.6 µg kg $^{-1}$ in body weight. However, the European Commission asked the European Safety Authority (EFSA) to review the tolerable value of MeHg $^+$ (EFSA, 2012). Thus, the EFSA published in 2012 a scientific opinion on the risk of human exposure to mercury and methylmercury (EFSA, 2012). According to new epidemiological studies in children, the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) established a tolerable weekly intake (TWI) for MeHg $^+$ of 1.3 µg kg $^{-1}$ in body weight, expressed as mercury (EFSA, 2012).

Although the Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 does not provide limits for MeHg⁺ concentration, total Hg limits of 0.5 mg kg⁻¹ and 1 mg kg⁻¹ are given for distinct seafood (according to seafood type) (Commission Regulation (EC) No 1881/2006). The Brazilian Normative Instruction N° 14 (May 2009) regulates the maximum level of total Hg in fish farming and predator fish. The established limits are 1 mg kg⁻¹ for predator fish and 0.5 mg kg⁻¹ for fish farming (Damin, Santo, Hennigen, & Vargas, 2013; PNCRC, 2009)

The toxicity of metals and their bioavailability depend on the chemical form of the metals. Thus, an accurate analytical method for Hg speciation is required to assess the real toxicity of samples (Harrington, 2000). Mercury speciation is generally performed by chromatographic separation techniques coupled with different detectors (Zhang, Yang, Dong, & Xue, 2012). The chromatographic separation techniques include: gas chromatography (GC) (Barst et al., 2013; Kenšová, Kružíková, & Svobodová, 2012; Nevado et al., 2011), liquid chromatography (HPLC) (Batista, Rodrigues, De Souza, Oliveira Souza, & Barbosa Jr., 2011; Chen, Han, Cheng, Liu, et al., 2013; Chen, Han, Cheng, Wang, et al., 2013) and ionic chromatography (IC) (Shade & Hudson, 2005). The most commonly used detectors are: inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Batista et al., 2011; Clémens, Monperrus, Donard, Amouroux, & Guérin, 2011), atomic absorption spectroscopy (AAS) (Naozuka & Nomura, 2011; Sarıca & Türker, 2012), atomic fluorescence spectrometry (AFS) (Nevado et al., 2011; Zhang et al., 2012), electron capture detector (ECD) (Kehrig et al., 2009; Kenšová et al., 2012), microwave induced plasma-atomic emission spectrometry (MIP-AES) (Sanz, De Diego, Raposo, & Madariaga, 2003), atomic emision detection (AED) (Kuballa, Leonhardt, Schoeberl, & Lachenmeier, 2011) and isotope dilution mass spectrometry (IDMS) (Demuth & Heumann, 2001).

The goal of the study was to determine total Hg and Hg species in seafood samples comprising fish, crustaceans and bivalves. The study focused on the extraction, identification and accurate quantification of MeHg⁺, the most toxic form, which was selectively separated and determined by liquid chromatography coupled to on-line UV irradiation and cold vapour atomic fluorescence spectroscopy (LC-UV-CV-AFS). Sample preparation was optimized to be as simple as possible, but still provide adequate sensitivity and specificity for the routine analyses of seafood.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

Total Hg was measured by an Agilent 7500ce ICP-MS (Agilent, Germany) with a BURGENER Ari Mist HP type nebulizer. For Hg speciation, an HPLC system with a quaternary pump and degasser (Agilent Technologies 1100, Waldbronn, Germany) equipped with a

manual stainless steel sampler injector (Rheodyne 7725i) and a 100 μL sample loop was used. Mercury species (iHg and MeHg⁺) were separated in an analytical RP-C₁₈ column (ODS Hypersyl 250 mm \times 4.6 mm id, 5 μ m, Thermo Hypersil-Keystone). After separation, a photo-oxidation step was performed in a 12 meterlong × 0.5 mm id PTFE tube coiled around a UV lamp with 150 W of power irradiation (Heraeus TO 150). The reduction step was achieved in a cold vapour generator (CV) 10004 (P.S. Analytical. Orpington, UK), in which the effluent is mixed with the reducing agent. The metallic mercury vapour obtained reaches the gas-liquid separator, from which it is dragged into the detector by an argon stream and dried in a PermaPure membrane with nitrogen. A Merlin Mercury Atomic Fluorescence Detector, model 10023 (P.S. Analytical), was used for measurements. A microwave (Milestone Ethos Touch Control) was used for digesting and extracting the samples. The fish samples supplied by MAPA (Brazil) were lyophilized in a ModulyonD Freeze Dryer lyophilizer (Thermo Electron Corporation, USA) and milled in an A 11 Basic micro-mill (IKA - Werke, Germany).

2.2. Reagents and standards

Only analytical grade reagents were used in this study. The standards and reagents were prepared with doubly deionized water (Elix&Rios 5–15 M Ω cm $^{-1}$, Total Organic Carbon <30 μg L $^{-1}$) obtained from the Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). An inorganic mercury stock standard solution of 1000 mg L⁻¹ was prepared by dissolving appropriate amounts of mercury chloride, HgCl₂ (Merck, Darmstadt, Germany), in 1% (v/v) HNO₃, from 69% nitric acid (Panreac, Hiperpur). A methylmercury stock standard solution of 1000 mg L⁻¹ was prepared by dissolving appropriate amounts of CH3HgCl (Carlo Erba, Milan, Italy) in 3% Methanol (Panreac, p.a.). All stock standard solutions were stored at 4 °C. The working standard solutions were prepared daily from the stock standard solutions by appropriate dilution. For cold vapour generation, SnCl₂ solution was prepared daily from tin chloride 2hydrate (Panreac, p.a.) to 1.5% concentration, in 4% of HCl, from 35% hydrochloric acid (Panreac, Hiperpur). Mobile phase was prepared daily by dissolving appropriate amounts of pyrrolidinedithiocarbamate, APDC, (Fluka, p.a.) and ammonium acetate, NH₄CH₃COO, (Merck, p.a.) in water. pH was adjusted with diluted acetic acid (Panreac, p.a.) and then filtered in a 0.45 µm filter (HAtype Millipore). The final mobile phase composition was 20% of the APDC and NH₄CH₃COO solution and 80% of methanol HPLCgradient grade (Panreac, p.a.). For microwave digestion samples, 31% H₂O₂ (Merck, Selectipur) and 69% HNO₃ (Panreac, Hiperpur) were used. For microwave extraction, 4 M HCl was prepared from 35% hydrochloric acid (Panreac, Hiperpur).

2.3. Reference materials and samples

The following certified reference materials (CRM) were used for quality control: DOLT-4 (Dogfish), TORT-2 (Lobster Hepatopancreas) (both from the National Research Council, Canada) and BCR-463 (Tuna fish) (Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre, Geel, Belgium). DOLT-4 was also used to assess the selection of extractant agent.

Five fresh fish muscle samples were provided by the Laboratory of Trace Metals and Contaminants (LANAGRO/RS) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA/Brazil). These samples were initially washed with Milli-Q water, cut and then lyophilized for a period of 5 hours. They were then ground in a vibratory mill and sieved through 85 μm polyester mesh to improve the particle size distribution.

Eleven fish samples and a clam sample were supplied by the Public Health Agency Laboratory, Barcelona (ASPB, Barcelona, Spain). Three crustacean samples and four bivalve samples were purchased from local supermarkets in Barcelona, Spain, during 2013. All samples were washed with Milli-Q water, cut and homogenized using a blender (non-contaminating kitchen mixer; Multiquick 5 Hand Processor, Braun, Barcelona, Spain). After homogenization, samples were stored in the freezer at $-18\,^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.4. Procedures

2.4.1. Moisture determination

The moisture of samples was determined in triplicate by drying 0.5 g aliquots in an oven at 102 ± 3 °C until constant weight. Moisture ranged from 5% (lyophilized samples) to 88% (fresh samples); all results were expressed as dry mass.

2.4.2. Total mercury analysis

The total mercury content in seafood and CRM samples was determined by ICP-MS following microwave digestion. Initially, 0.1–1 g of samples were weighed in digestion vessels, after which 8 mL of concentrated nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide were added. The microwave digestion procedure was as follows: 10 min from room temperature to 90 °C, maintained for 5 min at 90 °C, 10 min from 90 °C to 120 °C, 10 min from 120 °C to 190 °C and 10 min maintained at 190 °C. After cooling to room temperature, the digested samples were diluted in water up to 20 mL.

Total Hg was measured in the digested samples by ICP-MS. Helium gas was used in the collision cell to avoid interference in the ICP-MS measurements. A solution of ⁹Be, ¹⁰³Rh and ²⁰⁵Tl was used as the internal standard. The samples were quantified by means of an external calibration curve from inorganic mercury standards. Analyses in triplicate were performed for each sample. For quality control purposes, the standards of the calibration curve were run before and after each sample series. The corresponding digestion blanks (one for each sample digestion series) were also measured. Quality control standard solutions at two concentrations were measured at the end of the sequence to ensure stable instrument sensitivity. To assess the accuracy of the ICP-MS method, three CRMs (DOLT-4, TORT-2 and BCR-463) were analysed.

2.4.3. Mercury speciation analysis

The mercury speciation content in seafood and CRM samples was determined by LC-UV-CV-AFS following microwave extraction. The samples and CRMs were weighed in digestion vessels (0.1-1 g) and 10 mL of hydrochloric acid 4 mol L⁻¹ were added to perform a microwave-assisted extraction (MAE). The microwave extraction procedure was as follows: 2 min from room temperature to 100 °C and 10 min maintained at 100 °C. After cooling to room temperature, the extraction samples were filtered through paper filters (Whatman 40). Mercury species were measured in the extracts by LC-UV-CV-AFS. The performance characteristics of the hyphenated system are those described by Ibañez-Palomino et al. (2012). Mercury species in extracts were identified by comparison of retention times with standards. External calibration curves quantified MeHg⁺ and iHg, according to the corresponding standards. All samples were analysed in triplicate. Extraction blanks were also analysed by LC-UV-CV-AFS in each work session. In each speciation run, two quality control standard solutions were measured at the end of the sequence to ensure stable instrument sensitivity. To assess the accuracy of the LC-UV-CV-AFS method, three CRMs (DOLT-4, TORT-2 and BCR-463) were analysed.

3. Results and discussion

3.1. Selection of extractant agent

This assay focused on the study of a quantitative species extraction method system for seafood matrices, suitable for the subsequent determination technique. Extraction methods performed by several authors during the last five years are summarised in Table 1. Both acidic and basic extraction methods are described. However, there is no knowledge about standardised extraction methods in seafood matrices. Therefore, to perform the extraction of Hg species in seafood, a preliminary test selecting two different extractant agents was run, to assess the main Hg species extracted. However, there is knowledge about a standardised extraction method for sediments: EPA 3200 (EPA, 2005). This method uses HNO_3 4 mol L^{-1} as extractant agent. It has also been taken into account that, in almost half the studies summarised in Table 1, hydrochloric acid was used as the extractant agent. Therefore, the extractants tested were HNO₃ 4 mol L⁻¹, such as EPA 3200 employs, and HCl 4 mol L^{-1} , as an adaptation of this method. The present method is based on a microwave-assisted extraction, whose procedure is described in Section 2.4.3. For this study, the CRM DOLT-4 (Dogfish) was used. In DOLT-4, MeHg⁺ and iHg were the species present in the extracts. Fig. 1 shows chromatograms obtained from hydrochloric and nitric acid DOLT-4 extracts, in which Hg species are highlighted. Recoveries obtained for MeHg⁺ were 95% and 86%, using HCl and HNO₃, respectively. On measuring iHg, the concentration obtained when using HCl was 46% of the total certified content: whereas, when using HNO₃, the figure was 85%. This increase could be attributed to the oxidising action of HNO₃. As MeHg⁺ recovery with the HNO₃ extraction method is 9% less than recovery with HCl extraction, there is evidence that this difference could be caused by MeHg⁺ conversion to iHg. Therefore, $HCl 4 mol L^{-1}$ was selected as the extractant agent.

3.2. Quality parameters

3.2.1. Analysis of the total Hg

Three CRMs (TORT-2, DOLT-4 and BCR-463) were analysed to verify the accuracy of the proposed method. Concomitant analyses of TORT-2, DOLT-4 and BCR-463 verified the accuracy of the determination of total Hg (Table 2). The analysis of one CRM for each sample group was used in total Hg measurements. The use of CRMs guaranteed the quality control of acid digestion (sample pretreatment). The values for total Hg concentration, together with the corresponding certified value, are given in Table 2. According to the Student's t-test, no significant difference at a 95% confidence level was found in the data shown in Table 2. Repeatability was checked by analysis of CRMs (different replicates) 6 times throughout the day (Table 2). The RSD (%) values were: 7% for TORT-2 and 4% for DOLT-4. The instrument detection (LOD) and quantification limits (LOQ) were calculated as three times the standard deviation (3σ) and ten times the standard deviation signal (10σ) of ten digestion blanks, respectively (Llorente-Mirandes, Calderón, Centrich, Rubio, López-Sánchez, 2014). The results obtained $0.001 \text{ mg Hg kg}^{-1}$ for LOD and $0.003 \text{ mg Hg kg}^{-1}$ for LOQ.

3.2.2. Analysis of Hg species

The accuracy of the method proposed for MeHg⁺ speciation was verified by analysis of BCR-463 (Tuna fish), DOLT-4 (Dogfish liver) and TORT-2 (Lobster hepatopancreas) CRMs. The values for each CRM are given in Table 2 and did not differ significantly at a 95% confidence level from certified values. The amount of iHg was also analysed in the BCR-463, DOLT-4 and TORT-2 CRMs. The recovery for each CRM was calculated by comparing the sum of MeHg⁺ and

Table 1MeHg⁺ concentrations in seafood samples found in literature since 2009.

Type of seafood	Samples	Extraction procedure	Extracting agent	Technique	MeHg ⁺ (mg kg ⁻¹)	MeHg ⁺ %	Reference
Fish	Chub muscle	Stirring manually with a glass rod	Toluene	GC-EDC	<0.5	-	Sedláčková, Kružíková, & Svobodová, 2014
Fish	Tuna Emperor fish Red grouper Bass	Ultrasonication	2-mercaptoethanol, L-cysteine and HCl	ID-LC-ICP-MS	0.04-1.92	83–98	Montero-Alvarez et al., 2014
	Aquarium fish Snook black Grunt						
	Bream Dogtooth herring Mackerel Nurse shark						
Fish	Bearded brotula Tuna Pirarucu Salmon	Microwave	L-cysteine	LC-CV-ICP-MS	0.01-1.00	-	Schmidt, Bizzi, Duarte, Dressler, & Flores, 2013
	Whitemouth croaker Mullet						
Fish	Arctic char Spotted gar Largemouth bass Bowfin Catfish	Water bath	HNO ₃	GC-CVA-FS	0.5–1.5	-	Barst et al., 2013
Fish	Pomfret Hairtail Croaker	Ultrasonication	HCl + L-cysteine	LC-ICP-MS	0.17-0.75	More than 86%	Chen, Han, Cheng, Wang, et al., 2013
Fish	Japanese seabass Pomfret Hairtail Croaker	Ultrasonication	HCl + Sodium 3-mercapto-1- propanesulfonate	LC-ICP-MS	0.0032-0.75	More than 86%	Chen, Han, Cheng, Liu, et al., 2013
	Japanese seabass Silver carp Black carp Goldfish						
Fish	Northern snakehead Tapertail	Microwave	HCl	CE-ICP-MS	1.2-3.2	_	Zhao et al., 2012
Shellfish	Anchovy Mussel Razor clam Baby clam	Ultrasonication	HCI	EVG-AFS	0.022-0.034	-	Zhang et al., 2012
Fish	Chub Pike Bream	Stirring	Toluene	GC-ECD	0.05-0.8	46-100	Kenšová et al., 2012
	Roach Asp Carp						
	Eel Perch Tench Trout						
Fish	Grayling Nase Carp	Microwave	ТМАН	GC-AFS	0.001-1.16	60-88	Nevado et al., 2011
Fish	Catfish Red snapper Orange-spotted grouper Snubnose pompano	Wet digestion	KOH-methanol	GC-CV-AFS	0.007-0.12	37-81	Liang et al., 2011
Fish	Sea fish from local markets (Wuhan, China)	Ultrasonication	HCl	LLME-CE-UV	0.004-0.027	-	Li, Zhang, & Hu, 2011
Fish	Saithe Salmon Smoked salmon Tuna	a) Solid—liquid extractionb) Microwavec) Extraction at	ТМАН	ID-GC-ICP-MS	0.002-0.58	84-97	Clémens et al., 2011
Shellfish	Canned tuna Mussel Oyster Scallop	room temperature			0.001-0.033	28-98	
Fish	Shrimp Catfish Carp	Water bath	КОН	HS-SPME-GC-AFS	0.76	74	Carrasco et al., 2011

Table 1 (continued)

Type of seafood	Samples	Extraction procedure	Extracting agent	Technique	$ m MeHg^+ \ (mg~kg^{-1})$	MeHg ⁺ %	Reference
Shellfish	Mussels Octopus	Ultrasonication	HCl + L-cysteine + 2-mercaptoethanol	LC-ICP-MS	0.003-0.037	_	Batista et al., 2011
	Shrimps		•				
	Squids						
Fish	Tuna				0.03 - 0.16		
Fish	German market	alkaline digestion	Methanolic potassium hydroxide solution	GC-AED	0.006-0.5	14-100	Kuballa et al., 2011
Fish	Canned fish	According to reference	According to reference	GC-ECD	0.002-0.1	40-110	Miklavčič et al. 2011
Fish	Fish from Qinghai and Tibet plateau	Shaking	Alkaline extraction	LC-CV-AFS	0.1-0.6	84–89	Wang et al., 2010
Fish	Common carp Crucian carp Catfish Java tilapia Chinese soft shell turtle	Shaking	Alkaline extraction	LC-UV-AFS	0.1-0.4	35–76	Fu et al., 2010
Fish	Tuna and mackerel	Shaking and centrifugation	H ₂ SO ₄ + KBr + toluene + cysteine	GC-ECD	0.29-0.69	70–82	Hajeb et al., 2010
Fish	Grass carp	Over digestion	KOH-methanol	CV-AFS	0.02 - 0.09	7.4 - 93	Qiu et al., 2009
Fish	King mackerel Red snapper	Ultrasonication	Perchloric acid + L-cysteine + toluene + methanol	LC-ICP-MS	0.05-0.3	80	Santoyo et al., 2009

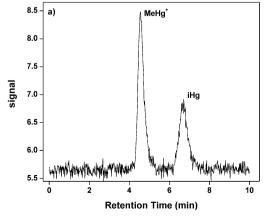
iHg concentration, obtained by the proposed speciation method (LC-UV-CV-AFS) and total Hg concentration (ICP-MS). The total Hg concentration was taken as 100% in the calculation of recovery values. The recoveries analysed for CRMs showed a range between 80 and 102% (Table 2).

Additionally, standards of MeHg $^+$ were spiked in solid samples of tuna-2, forkbeard, prawn-1, cockle and BCR-463. After addition of standards, the solid samples were homogenized. The extraction procedure was carried out only 30 minutes after the spiking procedure. The recoveries found for tuna-2, forkbeard, prawn-1, cockle and BCR-463 were 93 ± 3 , 85 ± 5 , 93 ± 2 , 87 ± 4 and 97 ± 2 (mean $\% \pm$ standard deviation, n = 3), respectively. These recovery values were calculated according to the literature (Santoyo, Figueroa, Wrobel, & Wrobel, 2009) and show good recovery of MeHg $^+$. As an example, Fig. 2 shows the chromatograms of tuna-2, forkbeard, prawn-1 and cockle. The tuna-2 was fortified with 0.20 mg Hg kg $^{-1}$ of MeHg $^+$; the forkbeard, with 0.35 mg Hg kg $^{-1}$ of MeHg $^+$; and the prawn-1 and cockle, with 0.10 mg Hg kg $^{-1}$ of MeHg $^+$. As can be seen, MeHg $^+$ was recovered successfully from the four samples.

Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for mercury species were estimated. To calculate LOD and LOQ, the standard deviation of the base line and the chromatographic peak base of each analyte (SD_{BLANK}), multiplied by 3 or 10 (LOD and LOQ, respectively), were interpolated in the slope of the height calibration curve (Ibáñez-Palomino, López-Sánchez, & Sahuquillo, 2012b), which is expressed as: LOD = 3 SD_{BLANK}/slope; LOQ = 10 SD_{BLANK}/slope. The instrument limits were converted to sample limits by multiplying by the extraction dilution factor. The LODs were 0.0003 and 0.0004 mg Hg kg $^{-1}$ for MeHg $^{+}$ and iHg, respectively. The LOQs were 0.0010 and 0.0012 mg Hg kg $^{-1}$ for MeHg $^{+}$ and iHg, respectively.

3.3. Total Hg in samples

Total Hg concentration was determined in 24 seafood samples: 5 Brazilian fish samples and 19 Spanish seafood samples. The samples were classified as fish (n = 16), crustaceans (n = 3) and bivalves (n = 5); the values found for total Hg in seafood samples are given in Table 3. Total Hg concentration ranged from 0.07 to 2.33 mg kg⁻¹, with the crustaceans and bivalves showing less total Hg than fish samples. Comparison of total Hg concentration means showed that crustaceans and bivalves had 0.07 mg kg⁻¹ dry mass (dm) and



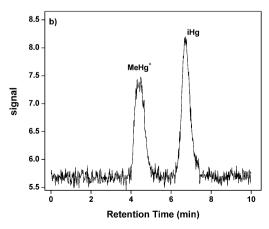


Fig. 1. Chromatograms obtained for DOLT-4 using microwave assisted extraction with (a) HCl 4 mol L⁻¹ and (b) HNO₃ 4 mol L⁻¹.

Table 2 Total mercury and mercury species in certified reference materials; concentrations are expressed as mg Hg kg⁻¹ dry mass (mean \pm SD, n = 3).

Sample		Total Hg	MeHg ⁺	iHg	Sum of Hg species	Recovery %
TORT-2	measured value certified value	0.30 ± 0.02 0.27 ± 0.06	0.161 ± 0.010 0.152 ± 0.013	0.081 ± 0.002	0.242 ± 0.012	80
DOLT-4	measured value certified value	2.68 ± 0.11 2.58 ± 0.22	1.27 ± 0.04 1.33 ± 0.12	1.19 ± 0.02	2.46 ± 0.06	92
BCR-463	measured value certified value	2.86 ± 0.15 2.85 ± 0.16	2.78 ± 0.16 3.04 ± 0.16	0.16 ± 0.20	2.94 ± 0.36	102

0.12 mg kg $^{-1}$ wet mass (wm), while fish had a mean of 0.71 mg kg $^{-1}$ dm and 0.59 mg kg $^{-1}$ wm. These results are consistent with the literature (Batista et al., 2011; Clémens et al., 2011; Krystek & Ritsema, 2006). According to Krystek and Ritsema (2006), significant differences in Hg levels are found in different seafood species analysed. Fish at high trophic levels in the food chain, like large predatory fish, accumulate more Hg and contain significantly higher concentration levels. Two predatory Brazilian fish samples (red porgy-1 and red porgy-2) and two predatory Spanish fish samples (tuna-3 and swordfish-1) showed the highest levels of total Hg: 1.63 ± 0.04 mg kg $^{-1}$ (red porgy-1), 1.15 ± 0.01 mg kg $^{-1}$ (red porgy-2), 2.33 ± 0.03 mg kg $^{-1}$ (tuna-3) and 1.04 ± 0.03 mg kg $^{-1}$ (swordfish-1).

The Brazilian government, through its Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), instituted a reference value of 0.5 mg kg⁻¹ for total Hg in fish farming and 1 mg kg⁻¹ for predator fish (Damin et al., 2013; PNCRC, 2009). Two of the five Brazilian samples (red porgy-1 and red porgy-2) were above the values recommended by the Brazilian government (Table 3). All Spanish samples had concentrations of total Hg below the maximum levels

set by EC Regulation No 1881/2006 (Commission Regulation (EC) No 1881/2006), except for tuna-3 and swordfish-1 samples (2.33 \pm 0.03 mg kg $^{-1}$ and 1.04 \pm 0.03 mg kg $^{-1}$, respectively). These data demonstrate the need to carry out speciation in seafood samples to discern the more toxic species.

3.4. Hg species in seafood samples

The concentrations of MeHg $^+$ found in the literature since 2009 are given in Table 1. These concentrations vary widely, depending on the extraction and detection method. According to Table 1, the concentrations of MeHg $^+$ ranged from 0.001 to 3.2 mg kg $^{-1}$ for seafood samples. However, bivalves, mollusks and crustaceans have lower MeHg $^+$ concentration than fish. Zhang et al. (2012) found concentrations between 0.022 and 0.034 mg Hg kg $^{-1}$ (in the form of MeHg $^+$) for mussel and clam samples. Clémens et al. (2011) found concentrations of 0.001 and 0.033 mg Hg kg $^{-1}$ (in the form of MeHg $^+$) for mussel, oyster, scallop and shrimp; and Batista et al. (2011), of 0.003 and 0.037 mg Hg kg $^{-1}$ (in the form of MeHg $^+$) for mussel, octopus, shrimp and squid samples.

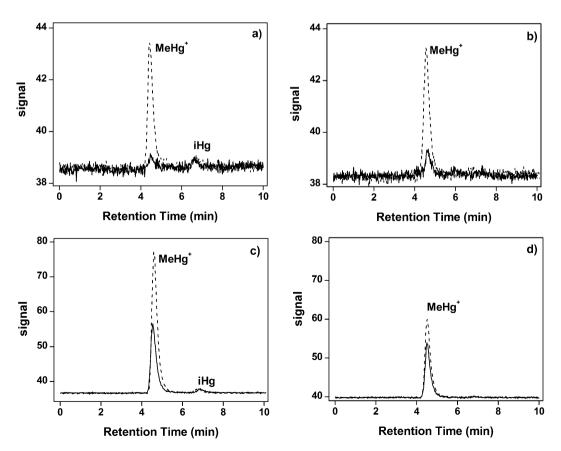


Fig. 2. Chromatograms of a) cokle extract b) prawn-1 extract c) forkbeard extract d) tuna-2 extract (continuous line: non-spiked sample and dotted line: sample spiked with MeHg⁺) by LC-UV-CV-AFS.

Table 3 Total mercury in seafood samples, concentrations are expressed as mg Hg kg⁻¹ wet mass (mean \pm SD, n=3).

Samples	Species	Trade name	Origin	Total Hg
Fish	Urophycis cirrata Pagrus pagrus Pagrus pagrus Merluccius hubbsi Merluccius gayi Phycis blennoides Sardina pilchardus Salmo sp. Salmo sp. Thunnus sp. Thunnus sp. Thunnus sp. Luvarus imperialis Xiphias gladius Xiphias gladius	White fish Red porgy-1 Red porgy-2 Hake-1 Hake-2 Forkbeard Sardine Salmon-1 Salmon-2 Tuna-1 Tuna-2 Tuna-3 Louvar Swordfish-1 Swordfish-2 Swordfish-3	Brazil Brazil Brazil Brazil Spain Spain Spain Spain Spain Spain Spain Spain Spain Spain Spain	$\begin{array}{c} 0.27 \pm 0.01 \\ 1.63 \pm 0.04 \\ 1.15 \pm 0.01 \\ 0.53 \pm 0.01 \\ 0.27 \pm 0.01 \\ 0.30 \pm 0.02 \\ 0.040 \pm 0.001 \\ 0.021 \pm 0.001 \\ 0.023 \pm 0.002 \\ 0.32 \pm 0.004 \\ 0.14 \pm 0.001 \\ 2.33 \pm 0.003 \\ 0.60 \pm 0.04 \\ 1.04 \pm 0.03 \\ 0.25 \pm 0.03 \\ 0.56 \pm 0.01 \end{array}$
Crustaceans	Aristeus antennatus	Prawn-1	Spain	0.013 ± 0.002
	Aristaeopsis edwardsiana	Prawn-2	Spain	<loq< td=""></loq<>
	Crangon crangon	Shrimp	Spain	<loq< td=""></loq<>
Bivalves	Tapes pullastra	Clams-1	Spain	0.015 ± 0.001
	Tapes Decussatus	Clams-2	Spain	0.018 ± 0.001
	Mytilus edulis	Mussel	Spain	< LOQ
	Cerastoderma edule	Cockle	Spain	0.009 ± 0.002
	Ostrea sp.	Oyster	Spain	0.007 ± 0.001

In this study, the Hg species were analysed from a selection of 24 seafood samples, including crustaceans, bivalves and fish. The results are given in Table 4. For all samples, the sum of MeHg⁺ and iHg concentration (obtained by the proposed speciation method, using LC-UV-CV-AFS) was compared with total Hg concentration (obtained by ICP-MS). The total Hg concentration was taken as 100% in the calculation of recovery values. All samples analysed showed recovery values between 88 and 120% (Table 4), which are corroborated by the literature (Chen, Han, Cheng, Liu et al., 2013; Clémens et al., 2011; Kenšová et al., 2012). Clémens et al. (2011) observed recoveries between 90 and 110% for matrices with low-fat content. High recovery values were observed for salmon, hake

and whitefish samples (fatty samples), with values of 120%, 117% and 114%, respectively (Clémens et al., 2011). Thus, close correlation between total and sum of species is achieved, regardless of sample matrix composition.

The presence of MeHg⁺ was detected in 19 analysed samples. MeHg⁺ was the predominant form of mercury in all fish samples and one shellfish sample (prawn-1). The clam-2 and cockle samples had only 13% and 36% of MeHg⁺, respectively. The mean values of percentage and concentration of MeHg⁺ in fish and shellfish samples were calculated. For fish, a mean percentage of 98%, a mean concentration of 0.71 mg MeHg⁺ kg⁻¹ in dry mass (dm) and a mean concentration of 0.60 mg MeHg⁺ kg⁻¹ in wet mass (wm) were found; and for shellfish, a mean percentage of 49%, a mean concentration of 0.027 mg MeHg $^+$ kg $^{-1}$ in dm and a mean concentration of 0.009 mg MeHg⁺ kg⁻¹ in wm. Inside the fish sample group, the highest concentrations of MeHg⁺ in wm were found for red porgy-1 and red porgy-2 (mean value 1.4 mg kg^{-1}), tuna-3 (2.23 mg kg^{-1}) and swordfish-1 $(1.04 \text{ mg kg}^{-1})$. In shellfish, the highest levels of MeHg⁺ were found for prawn-1 (0.011 mg kg⁻¹). The concentrations of all samples were within the maximum levels set by (EC) No. 1881/ 2006 for MeHg⁺ (Commission Regulation (EC) No 1881/2006), except for red porgy-1 and -2 (Brazilian fish samples), tuna-3 and swordfish-1 (Spanish fish samples), which showed concentrations higher than 1 mg kg^{-1} . In some samples, iHg was also identified. Table 4 shows that values of iHg concentration ranged from 0.010 to 0.085 mg iHg kg⁻¹ in wm in fish samples; and from 0.006 to $0.016 \text{ mg iHg kg}^{-1}$ in wm in shellfish samples. However, iHg was quantified only in four of the eight shellfish samples. These data underline the importance of speciation in seafood samples. Speciation makes it possible to establish which the most harmful form to humans is and, therefore, whether the seafood is suitable or not for consumption. Likewise, the need to introduce maximum levels of MeHg⁺ in seafood in Brazilian and European legislation should be considered in further Directives.

According to data obtained in this work, and as described in the literature, the concentrations of MeHg⁺ are higher in fish than shellfish being predatory fish those samples showing the highest values.

Table 4 Mercury speciation analysis of selected seafood samples; concentrations are expressed as mg Hg kg⁻¹ wet mass (mean \pm SD, n = 3).

Sample	MeHg ⁺	%MeHg ⁺	iHg	Sum of Hg species	Recovery (%)
White fish	0.30 ± 0.02	100	<loq< td=""><td>0.30 ± 0.02</td><td>114</td></loq<>	0.30 ± 0.02	114
Red porgy-1	1.67 ± 0.04	96	0.061 ± 0.009	1.73 ± 0.05	105
Red porgy-2	1.13 ± 0.06	97	0.035 ± 0.001	1.17 ± 0.06	101
Hake-1	0.62 ± 0.02	97	0.019 ± 0.002	0.64 ± 0.02	117
Hake-2	0.31 ± 0.04	100	<loq< td=""><td>0.31 ± 0.04</td><td>114</td></loq<>	0.31 ± 0.04	114
Forkbeard	0.32 ± 0.01	98	0.010 ± 0.003	0.33 ± 0.01	109
Sardine	0.040 ± 0.002	100	<loq< td=""><td>0.040 ± 0.002</td><td>100</td></loq<>	0.040 ± 0.002	100
Salmon-1	0.022 ± 0.001	100	<lod< td=""><td>0.022 ± 0.001</td><td>103</td></lod<>	0.022 ± 0.001	103
Salmon-2	0.025 ± 0.003	100	<lod< td=""><td>0.025 ± 0.003</td><td>120</td></lod<>	0.025 ± 0.003	120
Tuna-1	0.30 ± 0.05	98	0.011 ± 0.003	0.31 ± 0.05	95
Tuna-2	0.136 ± 0.008	100	<lod< td=""><td>0.136 ± 0.008</td><td>97</td></lod<>	0.136 ± 0.008	97
Tuna-3	2.23 ± 0.04	96	0.085 ± 0.004	2.31 ± 0.04	99
Louvar	0.64 ± 0.03	99	0.011 ± 0.001	0.65 ± 0.03	108
Swordfish-1	1.04 ± 0.04	98	0.02 ± 0.002	1.06 ± 0.05	102
Swordfish-2	0.26 ± 0.03	100	<lod< td=""><td>0.26 ± 0.03</td><td>102</td></lod<>	0.26 ± 0.03	102
Swordfish-3	0.58 ± 0.04	100	<loq< td=""><td>0.58 ± 0.04</td><td>103</td></loq<>	0.58 ± 0.04	103
Prawn-1	0.011 ± 0.003	100	<lod< td=""><td>0.011 ± 0.003</td><td>88</td></lod<>	0.011 ± 0.003	88
Prawn-2	<lod< td=""><td>_</td><td><lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<></td></lod<>	_	<lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<>	_	_
Shrimp	<lod< td=""><td>_</td><td><lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<></td></lod<>	_	<lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<>	_	_
Clams-1	<lod< td=""><td>_</td><td>0.016 ± 0.004</td><td>0.016 ± 0.004</td><td>108</td></lod<>	_	0.016 ± 0.004	0.016 ± 0.004	108
Clams-2	0.013 ± 0.001	13	0.008 ± 0.001	0.021 ± 0.002	110
Mussel	<lod< td=""><td>_</td><td><lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<></td></lod<>	_	<lod< td=""><td>_</td><td>_</td></lod<>	_	_
Cockle	0.003 ± 0.001	36	0.006 ± 0.002	0.009 ± 0.003	110
Oyster	<lod< td=""><td>_</td><td>0.007 ± 0.001</td><td>0.007 ± 0.001</td><td>100</td></lod<>	_	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	100

Higher MeHg⁺ content in fish samples could be related to the fat content. Methylmercury is a fat-soluble substance and therefore can be accumulated in the fatty tissues more easily than inorganic mercury. Bluefish samples, such as salmon and tuna with high fat content, present high levels of MeHg⁺. Whitefish and shellfish, with lower fat content, present lower MeHg + concentration and in the case of some shellfish samples the predominant mercury species is iHg.

When comparing the concentrations found in this study for MeHg⁺ in fish (Table 4) with the literature (Table 1), the values were similar (Chen, Han, Cheng, Liu, et al., 2013; Chen, Han, Cheng, Wang, et al., 2013; Clémens et al., 2011; Montero-Alvarez, Fernández de la Campa, & Sanz-Medel, 2014) or higher (Carrasco et al., 2011; Fu, Wang, Zhou, & Jiang, 2010; Hajeb, Jinap, & Ahmad, 2010; Kenšová et al., 2012; Kuballa, Moellers, Schoeberl, & Lachenmeier, 2011; Liang et al., 2011; Miklavčič et al., 2011; Nevado et al., 2011; Qiu, Feng, Wang, Fu, & Shang, 2009; Santoyo et al., 2009; Wang et al., 2010). The shellfish analysed had similar levels of MeHg⁺ to those found by Clémens et al. (2011). According to Fitzgerald, Lamborg, and Hammerschmidt (2007), the behaviour of Hg chemistry in the marine environment and the number of predatory fish analysed explain the differences between the mean values of MeHg⁺ found in several studies. The conditions of the water environment, the age of each species and the time of exposure to Hg contaminants are also factors that affect the results (Fitzgerald et al., 2007). The results obtained are in agreement with those reported by Kuballa et al. (2011), showing a great variability in MeHg⁺ concentration in different fish species. These differences reaffirm the need to monitor MeHg⁺ concentrations in seafood species more frequently and in different areas, in order to avoid human contamination.

4. Conclusion

This study determined total Hg, MeHg⁺ and iHg species in different seafood samples, including fish, crustaceans and bivalves. Figures of merit (LOD, LOQ, reproducibility and trueness) of the proposed LC-UV-CV-AFS procedure were satisfactory for the determination of MeHg⁺ and iHg in fish and shellfish. MeHg⁺ was the predominant species in all fish samples. The highest levels of MeHg⁺ in fish were found in two Brazilian fish samples and two Spanish fish samples. All concentrations are below the maximum levels set by Regulation (EC) No. 1881/2006 for MeHg⁺ except for these four fish samples, which showed concentrations higher than 1 mg kg⁻¹. Despite the lack of Brazilian legislation regulating the maximum levels of MeHg+ in seafood, the present results have increased the availability of reliable results on MeHg⁺ in seafood and could be used in further Directives on MeHg⁺ in food commodities. Thus, the present method could be a valuable tool for food control laboratories that assess MeHg⁺ in seafood samples.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (process n° BEX 12866121) and CNPQ for scholarships awarded to A.V.Z. and M.M.S. The authors thank the DGICYT (Project No. CTQ2010-15377) and the Grup de Recerca Consolidat (Project No. SGR2009-1188) for financial help received in support of this study. The authors are grateful to Josep Calderon from the Public Health Agency Laboratory, Barcelona, (ASPB) and to Maria Aparecida B. Espírito Santo and Isabel C. F. Damin from LANAGRO (RS, Brazil) for their kind donation of the seafood samples.

References

- Amin-Zaki, L., Elhassani, S., Majeed, M. A., Clarkson, T. W., Doherty, R. A., & Greenwood, M. (1974). Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics*. 54(5), 587–595.
- Baer, I., Baxter, M., Devesa, V., Vélez, D., Raber, G., Rubio, R., et al. (2011). Performance of laboratories in speciation analysis in seafood—Case of methylmercury and inorganic arsenic. *Food Control*, *22*(12), 1928—1934.
- Barst, B. D., Hammerschmidt, C. R., Chumchal, M. M., Muir, D. C., Smith, J. D., Roberts, A. P., et al. (2013). Determination of mercury speciation in fish tissue with a direct mercury analyzer. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(6), 1237–1241.
- Batista, B. L., Rodrigues, J. L., De Souza, S. S., Oliveira Souza, V. C., & Barbosa, F., Jr. (2011). Mercury speciation in seafood samples by LC—ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. *Food Chemistry*, 126(4), 2000–2004.
- Capar, S., Mindak, W., & Cheng, J. (2007). Analysis of food for toxic elements. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389(1), 159–169.
- Carrasco, L., Barata, C., García-Berthou, E., Tobias, A., Bayona, J. M., & Díez, S. (2011). Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). Chemosphere, 84(11), 1642—1649.
- Chen, X., Han, C., Cheng, H., Liu, J., Xu, Z., & Yin, X. (2013). Determination of mercurial species in fish by inductively coupled plasma mass spectrometry with anion exchange chromatographic separation. *Analytica Chimica Acta*, 796, 7–13
- Chen, X., Han, C., Cheng, H., Wang, Y., Liu, J., Xu, Z., et al.Hu, L. (2013). Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 1314, 86–96.
- Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. X., Amouroux, D., & Guérin, T. (2011). Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9), 2699–2711.
- CODEX STAN 193-1995. (2009). Codex general standard for contaminants and toxins in food and Feed.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December (2006) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. European Commission. Official Journal of the European Union, L 36, /5.
- Damin, I. C., Santo, M. A., Hennigen, R., & Vargas, D. M. (2013). Validation of a hydride generation atomic absorption spectrometry methodology for determination of mercury in fish designed for application in the Brazilian national residue control plan. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(12), 1103–1111.
- Demuth, N., & Heumann, K. G. (2001). Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Analytical Chemistry*, 73(16), 4020–4027.
- Dolbec, J., Mergler, D., Sousa Passos, C. J., Sousa de Morais, S., & Lebel, J. (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 73(3), 195–203.
- EFSA European Food Safety Authority. (2004). EFSA provides risk assessment on mercury in fish: Precautionary advice given to vulnerable groups.
- EFSA European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Journal, 10(12).
- EPA US Environmental Protection Agency. (2005). Method 3200-Mercury species fractionation and quantification by microwave assisted extraction. In *Selective solvent extraction and/or solid phase extraction*.
- Fitzgerald, W. F., Lamborg, C. H., & Hammerschmidt, C. R. (2007). Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chemical Reviews*, 107(2), 641–662.
- Fu, J., Wang, Y., Zhou, Q., & Jiang, G. (2010). Trophic transfer of mercury and methylmercury in an aquatic ecosystem impacted by municipal sewage effluents in Beijing, China. *Journal of Environmental Sciences*, 22(8), 1189–1194.
- Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 174–179.
- Hajeb, P., Jinap, S., & Ahmad, I. (2010). Biomagnifications of mercury and methylmercury in tuna and mackerel. *Environmental Monitoring and Assessment*, 171(1-4), 205-217.
- Harrington, C. F. (2000). The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(2), 167–179.
- Ibáñez-Palomino, C., López-Sánchez, J. F., & Sahuquillo, A. (2012a). Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: do they meet user needs?; a review. *Analytica Chimica Acta*, 720. 9–15.
- Ibáñez-Palomino, C., López-Sánchez, J. F., & Sahuquillo, À. (2012b). Inorganic mercury and methylmercury determination in polluted waters by HPLC coupled to cold vapour atomic fluorescence spectroscopy. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(7), 909–921.
- Kehrig, H.d. A., Seixas, T. G., Palermo, E. A., Baêta, A. P., Castelo-Branco, C. W., Malm, O., et al. (2009). The relationships between mercury and selenium in plankton and fish from a tropical food web. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(1), 10–24.

- Kenšová, R., Kružíková, K., & Svobodová, Z. (2012). Mercury speciation and safety of fish from important fishing locations in the Czech Republic. Czech Journal of Food Science, 30(3).
- Krystek, P., & Ritsema, R. (2006). Determination of Hg species in seafood. In *The determination of chemical elements in food* (pp. 707–726). John Wiley & Sons, Inc.
- Kuballa, T., Moellers, M., Schoeberl, K., & Lachenmeier, D. W. (2011). Survey of methylmercury in fish and seafood from the southwestern German market. *European Food Research and Technology*, 232(4), 737–742.
- Leopold, K., Foulkes, M., & Worsfold, P. (2010). Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Analytica Chimica Acta*, 663(2), 127–138.
- Li, P., Zhang, X., & Hu, B. (2011). Phase transfer membrane supported liquid—liquid—liquid microextraction combined with large volume sample injection capillary electrophoresis—ultraviolet detection for the speciation of inorganic and organic mercury. *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9414—9421.
- Liang, P., Shao, D.-D., Wu, S.-C., Shi, J.-B., Sun, X.-I., Wu, F.-Y., et al. (2011). The influence of mariculture on mercury distribution in sediments and fish around Hong Kong and adjacent mainland China waters. *Chemosphere*, 82(7), 1038–1043.
- Llorente-Mirandes, T., Calderón, J., Centrich, F., Rubio, R., & López-Sánchez, J. F. (2014). A need for determination of arsenic species at low levels in cereal-based food and infant cereals. Validation of a method by IC—ICPMS. *Food Chemistry*, 147, 377—385.
- Miklavčič, A., Stibilj, V., Heath, E., Polak, T., Tratnik, J. S., Klavž, J., et al. (2011). Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry*, 124(3), 711–720.
- Montero-Alvarez, A., Fernández de la Campa, M.d. R., & Sanz-Medel, A. (2014). Mercury speciation in Cuban commercial edible fish by HPLC-ICP-MS using the double spike isotope dilution analysis strategy. *International Journal of Envi*ronmental Analytical Chemistry, 94(1), 36–47.
- Naozuka, J., & Nomura, C. S. (2011). Total determination and direct chemical speciation of Hg in fish by solid sampling GF AAS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(11), 2257–2262.
- Nevado, J. B., Martín-Doimeadios, R. R., Bernardo, F. G., Moreno, M. J., Ropero, M. P., & de Marcos Serrano, A. (2011). Mercury speciation in fish tissues from a Mediterranean river basin: the Tagus River (central Spain) as a case study. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 61(4), 642–652.
- PNCRC National Residue Control in products of animal origin. (2009). Ministry of agriculture, livestock and food Supply of Brazil, normative Statement, N° 14/25, may 2009. Official Journal of Union, 1, 28–32.

- Qiu, G., Feng, X., Wang, S., Fu, X., & Shang, L. (2009). Mercury distribution and speciation in water and fish from abandoned Hg mines in Wanshan, Guizhou province, China. *Science of the Total Environment*, 407(18), 5162–5168.
- Santoyo, M. M., Figueroa, J. A. L., Wrobel, K., & Wrobel, K. (2009). Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi³⁺ as internal standard. *Talanta*, *79*(3), 706–711.
- Sanz, J., De Diego, A., Raposo, J., & Madariaga, J. (2003). Routine analysis of mercury species using commercially available instrumentation: chemometric optimisation of the instrumental variables. *Analytica Chimica Acta*, 486(2), 255–267.
- Sarica, D. Y., & Türker, A. R. (2012). Speciation and determination of inorganic mercury and methylmercury by headspace single drop microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry in water and fish. CLEAN—Soil, Air, Water, 40(5), 523—530.
- Schmidt, L., Bizzi, C. A., Duarte, F. A., Dressler, V. L., & Flores, E. M. (2013). Evaluation of drying conditions of fish tissues for inorganic mercury and methylmercury speciation analysis. *Microchemical Journal*, *108*, 53–59.
- Sedláčková, L., Kružíková, K., & Svobodová, Z. (2014). Mercury speciation in fish muscles from major Czech rivers and assessment of health risks. Food Chemistry, 150, 360–365.
- Shade, C. W., & Hudson, R. J. M. (2005). Determination of MeHg in environmental sample matrices using Hg – thiourea complex ion chromatography with online cold vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Environmental Science & Technology*, 39(13), 4974–4982.
- Storelli, M. M., Busco, V. P., & Marcotrigiano, G. O. (2005). Mercury and arsenic speciation in the muscle tissue of Scyliorhinus canicula from the Mediterranean sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(1), 81–88.
- Von Burg, R., & Greenwood, M. R. (1991). Mercury. In E. Merian, & T. W. Clarkson (Eds.), Metals and their compounds in the environment: Occurrence, analysis, and biological relevance. VCH.
- Wang, Z-h., Yin, Y.-g., He, B., Shi, J.-b., Liu, J.-f., & Jiang, G.-b. (2010). L-cysteine-induced degradation of organic mercury as a novel interface in the HPLC-CV-AFS hyphenated system for speciation of mercury. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(6), 810–814.
- Zhang, W.-B., Yang, X.-A., Dong, Y.-P., & Xue, J.-J. (2012). Speciation of inorganic- and Methyl-mercury in biological Matrixes by Electrochemical Vapor generation from an 1-cysteine Modified Graphite Electrode with atomic fluorescence spectrometry detection. *Analytical Chemistry*, 84(21), 9199–9207.
- Zhao, Y., Zheng, J., Fang, L., Lin, Q., Wu, Y., Xue, Z., et al. (2012). Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis—inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 89, 280—285.