

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Especiação química de arsênio inorgânico em arroz por espectrometria de
absorção atômica com geração de hidretos

Camila Cerveira

Porto Alegre, agosto de 2015

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMILA CERVEIRA

Especiação química de arsênio inorgânico em arroz por espectrometria de
absorção atômica com geração de hidretos

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

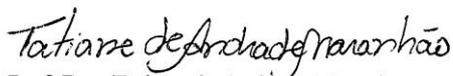
Orientador: Prof. Dra. Dirce Pozebon

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes

Porto Alegre, agosto de 2015

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto/2013 e agosto/2015, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Dirce Pozebon e Co-orientação do Professor Doutor Diogo Pompéu de Moraes. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

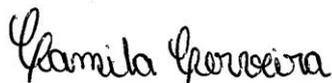

Prof. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão


Prof. Dra. Sandra Maria Maia


Prof. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira


Prof. Dra. Dirce Pozebon


Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes


Camila Cerveira

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais Cesar e Eliane por todo o amor, carinho e compreensão que têm me dedicado em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram na elaboração deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade concedida.

Aos meus orientadores Dirce Pozebon e Diogo Pompéu de Moraes por terem me aceitado como orientanda de mestrado, pela excelente orientação, pela paciência e sem os quais eu não teria dado estes muitos passos para chegar até aqui.

Ao professor Jiří Dědina que, durante suas breves passagens à Universidade, disponibilizou gentilmente do seu tempo e contribuiu de forma significativa.

Ao professor Valderi L. Dressler da Universidade Federal de Santa Maria que, gentilmente, forneceu os padrões para a realização deste trabalho, assim como os resultados obtidos da análise por ICP-MS.

Aos técnicos e ex-técnicos do Instituto de Química, em especial Márcia Kweissheimer, Alexsandro Dallegrave, Lucas Barnet e Artur L.G. Rocha pelo auxílio no decorrer das minhas atividades.

A todos os colegas do grupo de pesquisa pelas inúmeras ajudas que me deram e pelo bom convívio diário.

Aos meus queridos amigos Camila Martins, Katherine Kellermann, Guilherme Scheffler, Camila Correa, Mauro H. Dartora e Jucelaine Poletti, pela partilha da amizade, cafés, debates e crises existenciais.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPERGS pelo apoio e sustento deste projeto.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO PERÍODO

Resumos em congressos

1. **CERVEIRA, C.**; POZEBON, D.; MARTINS, C. A.; SCHEFFLER, G. L.; MORAES, D. P. Especiação de arsênio inorgânico em arroz mediante geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica. In: 4º ESPEQBrasil, Curitiba/PR, 2014.
2. SCHEFFLER, G. L.; **CERVEIRA, C.**; POZEBON, D. Efeitos da adição de N₂ ao gás nebulizador em ICP OES com configuração axial. In: XX Encontro de Química da Região Sul, Lajeado/RS, 2013.

Artigo completo relacionado com a dissertação publicado em periódico

1. **CERVEIRA, C.**; POZEBON, D.; MORAES, D. P.; FRAGA, J. C. S. Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS). *Analytical Methods*, 2015, 7, 4528-4534.

Trabalho realizado no período

1. MARTINS, C. A.; **CERVEIRA, C.**; SCHEFFLER, G. L.; POZEBON, D. Metal Determination in Tea, Wheat, and Wheat Flour Using Diluted Nitric Acid, High-Efficiency Nebulizer, and Axially Viewed ICP OES. *Food Analytical Methods*, 2014,8, 1652-1660.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 ARROZ.....	3
2.1.1 Morfologia do grão de arroz, tipos de plantio e tratamento.....	3
2.2 ARSÊNIO	5
2.2.1 Características e ocorrência	5
2.2.2 Toxicologia do arsênio.....	7
2.3 CONTAMINAÇÕES EM ALIMENTOS	8
2.3.1 Contaminação do arroz por As	9
2.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....	13
2.4.1 Métodos de extração das espécies de As	14
2.4.2 Separação e quantificação das espécies de As	16
2.5 GERAÇÃO DE HIDRETOS (HG)	17
2.5.1 Análise de especiação química de As baseada na HG.....	19
3. OBJETIVO.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	23
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	24
4.2.1 Limpeza do material	25
4.3 AMOSTRAS	26
4.3.1 Preparo da amostra para a determinação de As total	27
4.3.2 Procedimento de extração para especiação química de As.....	27
5. RESULTADOS.....	30
5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE HG-AAS PARA DETERMINAÇÃO DE As	30
5.1.1 Efeito da adição de ar no separador gás-líquido	30
5.1.2 Efeito do gás de arraste	32

5.1.3 Efeito da alça de reação	33
5.1.4 Efeito da vazão dos reagentes	33
5.2 INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DO HCl E NaBH ₄ NA ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE As INORGÂNICO.....	35
5.3 CONDIÇÕES DE REDUÇÃO PARA A ESPECIAÇÃO DE As INORGÂNICO	39
5.4 AVALIAÇÃO DA INTERCONVERSÃO ENTRE As(III) E As(V)	43
5.5 SENSIBILIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO	46
5.5.1 Parâmetros de mérito	46
5.5.2 Avaliação da exatidão do método	48
5.6 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL NAS AMOSTRAS DE ARROZ.....	48
5.7 DETERMINAÇÃO DE As INORGÂNICO NO ARROZ.....	50
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do grão de arroz. ¹⁸	4
Figura 2. Compostos de arsênio. Adaptado de Barra <i>et al.</i> ³¹	6
Figura 3. Evolução do número de publicações referentes à determinação de As (a) e especiação de As (b) no período de 1970 a maio de 2015.	10
Figura 4. Representação esquemática do sistema utilizado para a geração de hidretos e posterior detecção do As por HG-AAS. Carreador: HCl (4 mL min ⁻¹); agente redutor: NaBH ₄ (4 mL min ⁻¹); alça de amostragem: 250 µL; gás de arraste: argônio (50 mL min ⁻¹); vazão de ar introduzido no separador-gás líquido: 1,65 mL min ⁻¹	23
Figura 5. Influência do ar introduzido no separador gás-líquido na absorvância do As(III), na concentração de 10 µg L ⁻¹ . O carreador da amostra foi HCl 1 mol L ⁻¹ . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.	30
Figura 6. Efeito da vazão do gás de arraste na absorvância integrada do As(III) na concentração de 25 µg L ⁻¹ . Condições: NaBH ₄ 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L ⁻¹ . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.	32
Figura 7. Efeito da vazão do NaBH ₄ e HCl na absorvância integrada do As(III) na concentração de 10 µg L ⁻¹ . Condições: NaBH ₄ 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L ⁻¹ . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.	34
Figura 8. Influência da concentração do NaBH ₄ nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para 10 µg L ⁻¹ de cada espécie. Como carreador da amostra foi utilizado HCl 6 mol L ⁻¹ . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.....	35
Figura 9. Influência das concentrações de HCl (a) e de NaBH ₄ nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para 10 µg L ⁻¹ de cada espécie. Condições: (a) NaBH ₄ 0,1 % (m/v); (b) HCl 10 mol L ⁻¹ . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.	37
Figura 10. Efeito do pré-redutor L-cisteína na absorvância do As(V) após 7 leituras consecutivas da absorvância do As em solução contendo 10 µg L ⁻¹ de As(V). Condições: NaBH ₄ 0,1% (m/v) e HCl 10 mol L ⁻¹	40

- Figura 11.** Influência do pré-redutor KI/ácido ascórbico na absorvância integrada do As(V), para $3 \mu\text{g L}^{-1}$ da espécie. Condições: (A) KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v); (B) KI 0,5% (m/v) e ácido ascórbico 0,5% (m/v); (C) KI 1% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v). As soluções de KI/ácido ascórbico foram preparadas em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.....41
- Figura 12.** Influência da concentração de NaBH_4 nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie. As absorvâncias correspondem às espécies submetidas ao tratamento de pré-redução com KI (5% m/v) e ácido ascórbico (1% m/v), em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Como carreador da solução da amostra foi utilizado HCl 10 mol L^{-1} 42
- Figura 13.** Correlação entre as concentrações de (a) As inorgânico e As total, (b) As(V) e As inorgânico e (c) As(III) e As inorgânico nas amostras de arroz analisadas. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Relação das amostras de arroz analisadas.....	26
Tabela II. Programa do forno micro-ondas utilizado para digestão ácida do arroz.....	27
Tabela III. Programa do forno micro-ondas utilizado para extração das espécies inorgânicas (As(III) e As(V)) presentes nas amostras de arroz.....	28
Tabela IV. Procedimentos de preparo da amostra avaliados para a análise de especiação química de As em arroz.....	28
Tabela V. Valores de absorvância obtidos para as alças de reação com diferentes comprimentos. Foram utilizados HCl 1 mol L ⁻¹ , NaBH ₄ 0,5% (m/v) e solução contendo 25 µg L ⁻¹ de As(III). Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.	33
Tabela VI. Resumo das condições estabelecidas para a especiação química de As(III), As inorgânico e determinação de As total por HG-AAS.....	43
Tabela VII. Recuperação das espécies inorgânicas de As em HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹ , submetidas à radiação micro-ondas. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).	43
Tabela VIII. Recuperação das espécies de As adicionadas a uma amostra de arroz integral antes da etapa de extração. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).	44
Tabela IX. Concentrações de As(III) e As inorgânico encontradas no arroz em função dos meios extratores. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações (n = 3). As concentrações das espécies são em ng g ⁻¹	45
Tabela X. Concentrações de As(III) e As inorgânico encontradas em arroz integral, em função dos meios extratores. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações (n = 3). As concentrações das espécies são em ng g ⁻¹	46
Tabela XI. Parâmetros de mérito do método desenvolvido para especiação química de As inorgânico mediante HG-AAS.....	47
Tabela XII. Análise dos materiais de referência certificados submetidos à extração com HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹ e determinação de As por HG-AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).	48

Tabela XIII. Concentração de As total encontrada nas amostras de arroz. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações ($n = 3$)..... 49

Tabela XIV. Concentração das espécies de As encontradas no arroz mediante HG-AAS. A concentração de As(V) foi obtida por diferença (As inorgânico - As(III)). Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS: Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês, “*Atomic Absorption Spectrometry*”.
- AEAPTES: N-(β-aminoetil)-γ-aminopropiltriétoxissilano.
- AFS: Espectrometria de Fluorescência Atômica, do inglês, “*Atomic Fluorescence Spectrometry*”.
- ANOVA: análise de variância, do inglês, *Analysis of Variance*.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- As(III): arsenito.
- As(V): arsenato.
- As: arsênio.
- AsB: arsenobetaína.
- AsC: arsenocolina.
- ATP: adenosina trifosfato, do inglês, “*adenosine triphosphate*”.
- CRM: material de referência certificado, do inglês, “*Certified Reference Material*”.
- CV: Geração Química de Vapor, do inglês, “*Chemical Vapor Generation*”.
- CV-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, do inglês, “*Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*”.
- B: boro.
- DMA(III): ácido dimetilarsenioso.
- DMA(V): ácido dimetilarsínico.
- FAO: Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, do inglês, “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”.
- FDA: Administração de Comidas e Remédios, do inglês, “*Food and Drug Administration*”.
- FIAS: sistema de análise por injeção em fluxo, do inglês, “*Flow Injection Analysis System*”.
- HG: geração de hidretos, do inglês, “*Hydride Generation*”.

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

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

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

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

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

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

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

LD: Limite de detecção, do inglês, “*Limit of Detection*”.

LQ: Limite de Quantificação, do inglês, “*Limit of Quantification*”.

MMA(III): ácido monometilarsênico.

MMA(V): ácido monometilarsenioso.

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

P: fósforo.

PTFE: politetrafluoretileno.

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

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

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

RESUMO

Na presente dissertação é proposto um método de análise de especiação química de arsênio em arroz, que foi desenvolvido mediante a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS). A geração seletiva de hidreto a partir do As(III) foi obtida com NaBH_4 0,1% (m/v) e HCl 10 mol L^{-1} . O As inorgânico total foi determinado após pré-redução do As(V) e determinado juntamente com o As(III), nas mesmas condições utilizadas para o As(III). A concentração do As(V) foi estimada pela diferença entre o As(III) e As inorgânico total. Ácido ascórbico 1% (m/v) e KI 5% (m/v) na presença de HCl 1,2 mol de L^{-1} foram utilizados para redução do As(V) a As(III). As espécies de arsênio foram extraídas do arroz usando-se HNO_3 0,14 mol L^{-1} e radiação micro-ondas ou HNO_3 0,28 mol L^{-1} e aquecimento em banho-maria a 95 °C, antes da determinação do As por HG-AAS. A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação do analito e uso de material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1668a e ERM-BC211). O As total foi quantificado após extração com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2% (m/v) e HNO_3 10% (v/v) sob aquecimento em banho-maria a 90 °C, seguido da determinação do As por HG-AAS. Os limites de detecção do As(III) e As inorgânico foram 1,96 ng g^{-1} e 3,85 ng g^{-1} , respectivamente. O limite de detecção do As total foi 14 ng g^{-1} . O método foi aplicado na análise de 13 amostras de arroz de diferentes tipos (polido, integral, orgânico, e parboilizado) produzidas e comercializadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: As(III), As inorgânico, arroz, HG-AAS, especiação química.

ABSTRACT

A method for chemical speciation of inorganic arsenic in rice is proposed, which was developed using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS). Selective generation of arsine of As (III) was achieved using 0.1% (m/v) NaBH₄ and 10 mol L⁻¹ HCl. The inorganic As was determined by its pre reduction and determination under the same conditions used for As (III). The concentration of As(V) was estimated by difference among inorganic As and As(III). Ascorbic acid (1% m/v) and KI (5% m/v) in 1.2 mol L⁻¹ HCl were used for inorganic As pre reduction. The As species in rice were extracted using microwave radiation and 0.14 mol L⁻¹ HNO₃ or 0.28 mol L⁻¹ HNO₃ and heating in water bath prior to As determination by HG-AAS. The accuracy of the method was evaluated by analyte recovery test and analysis of certified rice flour (NIST 1668a and ERM-BC211). Total As in rice was extracted by 2% (m/v) K₂S₂O₈ and 10% (v/v) HNO₃ under heating in water bath, followed by As determination using HG-AAS. The detection limits of As(III) and inorganic As were 1.96 ng g⁻¹ and 3.85 ng g⁻¹, respectively. The detection limit of total As was 14 ng g⁻¹. The developed method was applied to analysis of thirteen samples of different types of rice (polished, brown, organic, and parboiled) produced and marketed in Rio Grande do Sul/Brazil.

Keywords: As(III), inorganic As, rice, HG-AAS, chemical speciation

1. INTRODUÇÃO

A determinação da concentração total de um elemento químico fornece informações limitadas no que diz respeito aos seus efeitos maléficos ou benéficos aos seres vivos, dado que diferentes espécies químicas podem ter diferente biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade. Um exemplo da importância da especificação química é o reconhecimento da forma química na qual um elemento, que no presente caso é o As, está presente em uma dada matriz de natureza ambiental e/ou biológica, isto porque as diferentes espécies do elemento conferem diferentes graus de toxicidade. Dentre as espécies de As, os compostos inorgânicos de As(III) e As(V) são cerca de 100 vezes mais tóxicos que as formas metiladas do elemento.^{1,2}

Quando comparado a outros alimentos, o grão de arroz possui concentrações mais elevadas de As devido à grande eficiência que a planta de arroz tem em absorver este elemento.² Vários estudos relatam a presença de As na sua forma mais tóxica no arroz, o As inorgânico, representando um potencial risco para a saúde humana.³⁻⁷ Uma vez que o arroz é um dos alimentos mais populares para alimentação humana a nível mundial, é evidente a necessidade de maiores informações sobre a concentração das diferentes espécies do contaminante no grão de arroz, sobretudo as espécies inorgânicas, no sentido de estabelecer valores de referência frente à diferente toxicidade de cada espécie, garantindo assim segurança no consumo do alimento.

Nos últimos anos, houve progressos significativos na análise de especificação química de As mediante emprego de técnicas de separação cromatográficas, principalmente a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) combinada com a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).^{2,4,8,9} A associação das duas técnicas garante a separação e detecção de espécies químicas presentes em baixa concentração na amostra analisada. No entanto, métodos envolvendo essas técnicas são caros, complexos e mais difíceis de serem utilizados em análises de rotina. Além disso, o processo de eluição pode levar a interconversão entre as espécies e a possível presença de elevados teores de carbono no eluente pode ocasionar depósitos na interface do instrumento de ICP-MS, além de interferências espectrais e não-espectrais.¹⁰

Uma alternativa frente ao uso de cromatógrafo para a separação das espécies químicas é a associação da geração de hidretos (HG) com técnicas de espectrometria atômica tais como a fluorescência atômica (HG-AFS), ICP-MS (HG-ICP-MS) ou a

absorção atômica (HG-AAS). O uso da geração de hidretos garante uma boa sensibilidade para a determinação de As, além de ser relativamente mais simples do que a separação das espécies por HPLC (técnica de separação que exige alta experiência e conhecimento do analista). Ainda, a HG-AAS permite a quantificação individual dos hidretos provenientes de diferentes espécies de As, uma vez que possuem diferente reatividade e sensibilidade frente ao agente redutor. Deve-se considerar também que a técnica HG-AAS ainda é a mais popular e preferida em termos de simplicidade, sensibilidade, precisão, rapidez e custo operacional.

Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos de separação das diferentes espécies de As, principalmente as mais tóxicas (as espécies de As inorgânico), e a determinação das mesmas através de instrumentação de baixo custo, como a HG-AAS, são necessários, devido à facilidade de aplicação em análise de rotina, podendo auxiliar órgãos fiscalizadores na obtenção de informações quanto às concentrações das espécies químicas de As em alimentos, principalmente, em arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARROZ

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa*) é considerado um alimento básico presente na alimentação de grande parte da população mundial. O seu cultivo é significativo em todo o planeta, uma vez que possui elevado valor nutricional quando comparado a outros cereais. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), apesar de contratempos naturais e econômicos, a produção mundial de arroz em 2014 foi 741,3 milhões de toneladas, sendo esperadas 749,8 milhões de toneladas para 2015.¹¹ Destacam-se como os maiores produtores mundiais a China, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Tailândia e Mianmar. O Brasil encontra-se como o oitavo maior produtor, sendo o primeiro país fora do continente asiático no “*ranking*”, seguido dos Estados Unidos da América.¹² Ainda, no Brasil, das 12,184 milhões de toneladas produzidas, cerca de 76% delas foi oriunda da Região Sul do país, sendo o Estado do Rio Grande do Sul responsável por 67% da demanda nacional.^{11,13}

O arroz contém proteínas, vitaminas, sais minerais, ferro, cálcio e fósforo.^{14,15} O cereal contribui com 20% da energia fornecida pela ingestão diária de alimentos, podendo essa contribuição ser substancialmente maior, chegando a 70% em países como Bangladesh, Camboja e Mianmar.^{3,14,15} Somente no Brasil, o consumo anual ultrapassa a marca de 50 kg de arroz/habitante.^{16,17} Por essas razões, o arroz é considerado um alimento estratégico em muitos países, tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento.

2.1.1 Morfologia do grão de arroz, tipos de plantio e tratamento

O arroz pertence ao grupo das monocotiledôneas, sendo o grão do arroz constituído da casca, do farelo e endosperma.¹⁴ Na Figura 1 é representada a morfologia do grão de arroz

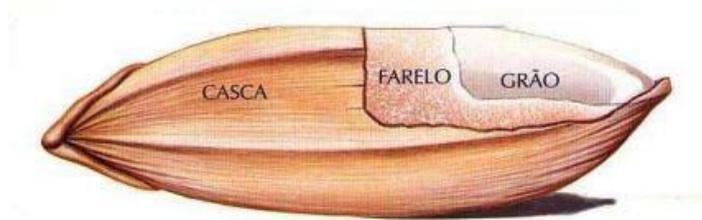


Figura 1. Morfologia do grão de arroz.¹⁸

A casca, camada protetora, é constituída da pálea e da lema, representando 20% do peso do grão. Já o farelo, considerado a parte mais nutritiva do grão, rico em lipídeos e proteínas, constitui aproximadamente 8% desse cereal. A parte interna do grão, denominada endosperma, é rica em amido e pobre em proteínas.¹⁴

Diferentemente dos outros cereais, o arroz pode ser cultivado em diferentes ecossistemas, sendo o ecossistema de irrigação controlada (várzea) mais utilizado na Região Sul do Brasil, destacando-se o Rio Grande do Sul. Já o plantio de terras altas (sequeiro) é concentrado na Região Centro-Oeste (estados do Mato Grosso e Goiás), Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia).¹⁹ O ecossistema de várzea é caracterizado pela inundação contínua e controlada da lavoura durante o período de crescimento da planta. Por outro lado, o ecossistema de terras altas (sequeiro) é caracterizado pelo plantio em terreno drenado, que recebe água oriunda apenas de precipitações pluviométricas para o desenvolvimento da planta de arroz.¹⁵

Após a colheita, o grão de arroz passa por diferentes processos de beneficiamento. Posteriormente à secagem do grão, com a remoção da camada protetora (a casca) é obtido o arroz integral, sendo constituído do farelo e endosperma do grão. Se após a remoção da casca o cereal também passar pelo processo de remoção do farelo, chamado de polimento do grão, o arroz branco polido será obtido. O grão do arroz também pode passar por processo hidrotérmico, onde ainda com a casca, o grão é submetido a um cozimento parcial para a obtenção do arroz parboilizado. Esse arroz parboilizado pode ser descascado, resultando no arroz parboilizado integral, ou ainda descascado e polido, obtendo-se o arroz parboilizado polido.^{14,16,20,21} No Brasil, a preferência é pelo arroz polido, seguido do arroz parboilizado e integral.

Além dos diferentes tipos de beneficiamento, o grão de arroz pode ser classificado segundo o tamanho (classe) e pela qualidade dos grãos (tipo). A classificação segundo o tipo é baseada na proporção de grãos inteiros para grãos

defeituosos, compreendendo uma escala de 1 a 5, sendo o primeiro o de melhor qualidade. Já a classificação segundo a classe, baseada no tamanho do grão, compreende o arroz curto, médio, longo, longo e fino e misturado.²²

O sistema de produção de arroz livre de agrotóxicos, herbicidas, pesticidas ou quaisquer outros produtos químicos (arroz orgânico) vem crescendo devido a uma maior procura por alimentos saudáveis, além da redução do impacto ambiental. Ainda, além do arroz orgânico, há o cultivo do arroz biodinâmico. Este segue os mesmos princípios do plantio orgânico, ou seja, sem a intervenção de fertilizantes ou agrotóxicos; o adubo é à base de erva medicinal, sílica e esterco, o qual é adicionado ao solo em doses homeopáticas, visando o equilíbrio do sistema solo-planta-animal.²³ Vale ressaltar que a produção deste tipo de arroz necessita de certificação, no sentido de garantir ao consumidor a qualidade do produto final.²⁴

2.2 ARSÊNIO

2.2.1 Características e ocorrência

O As tem sido alvo de controvérsias na história da humanidade, desde que foi isolado pela primeira vez no ano de 1250 por Albertus Magnus. No decorrer dos anos, histórias de envenenamento, homicídios e suicídios por As foram relatadas, sendo o elemento um veneno popular entre a Idade Média e meados do século XX, pela facilidade de misturar o mesmo com alimentos devido ao aspecto inofensivo e sabor levemente adocicado.^{25,26} Um dos casos mais famosos associado ao As é o falecimento de Napoleão Bonaparte, onde se acredita que a morte do imperador francês pode estar relacionada com o envenenamento por As.²⁵

Até meados do século XX, compostos arsenicais foram amplamente empregados para o tratamento de dermatites, além de serem prescritos como fortificantes e tônicos. Um caso curioso a respeito do uso de compostos de As é a ingestão do trióxido de arsênio (As_2O_3) pela população andina; no passado, o composto era consumido para aumentar a capacidade respiratória, permitindo assim um melhor deslocamento através das montanhas.²⁷

Onipresente na flora e fauna, o As possui propriedades físicas e químicas intermediárias entre metal e não metal, sendo atualmente referenciado como um metalóide. O As pode ser encontrado em vários estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5),

sendo As(III) e As(V) os estados de oxidação predominantes em condições redutoras e oxidantes, respectivamente.

Do ponto de vista toxicológico e biológico, podemos separar os compostos de As em três grandes grupos: i) compostos inorgânicos de As, como o arsenito (As(III)) e arsenato (As(V)), ii) compostos orgânicos de As, como o ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaina (AsB) e arsenocolina (AsC), e iii) gás arsina.²⁸⁻³⁰ A fórmula estrutural desses compostos de As é apresentada na Figura 2.

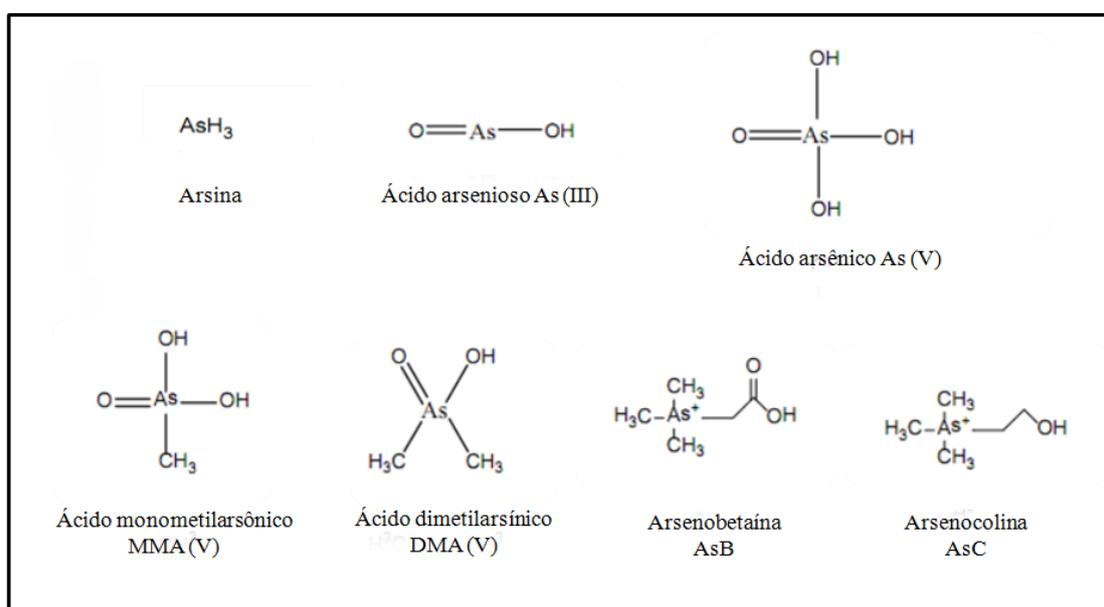


Figura 2. Compostos de arsênio. Adaptado de Barra *et al.*³¹

O As é o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre e pode estar presente na natureza como um contaminante ambiental, oriundo de fontes naturais ou antropogênicas. Um exemplo de contaminação relacionada a fontes naturais é a decorrente de erosão de rochas ou minerais, uma vez que existem mais de 200 espécies minerais que contêm o As em sua estrutura química, sendo a mais comum a arsenopirita.³⁰ Cerca de 60% do As liberado no meio ambiente é de origem natural, principalmente devido à atividade vulcânica.³²

Compostos de As foram amplamente empregados na agricultura como herbicidas, formicidas e inseticidas, na preservação de madeira e composição de

tintas.³⁰ Nos dias atuais, compostos de As são utilizados na indústria farmacêutica, na manufatura de materiais semicondutores e vidro, além de serem utilizados em rações de aves e suínos.^{30,32,33}

Uma vez que o As é encontrado naturalmente no meio ambiente, o consumo de alimentos e água contaminados é considerado a principal fonte de exposição ao metalóide através da ingestão, podendo chegar à faixa de 20 a 300 µg As/dia.³⁰

2.2.2 Toxicologia do arsênio

O As possui um comportamento paradoxal no que diz respeito a sua toxicidade, pois ao mesmo tempo em que pode estar associado a processos bioquímicos que ocorrem nos seres vivos, é considerado um elemento tóxico associado a doenças e efeitos carcinogênicos.³⁴

O efeito toxicológico do As depende da forma química na qual o elemento se apresenta. Conforme já mencionado anteriormente, a forma inorgânica é considerada a mais tóxica, sendo classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC)³⁵ como uma substância do Grupo 1 – carcinogênico para seres humanos – sendo associada ao desenvolvimento de câncer de pele, bexiga e rim, além de conjuntivites, doenças cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso central.^{1,8,30,33}

A exposição ao As em longo prazo pode causar aterosclerose, hipertensão, doenças isquêmicas do coração e arritmias. A exposição crônica ao As pode induzir o estresse oxidativo, levando ao aumento da pressão arterial.³⁶

Quando comparada a toxicidade das espécies, o As inorgânico é cerca de 100 vezes mais tóxico que o As orgânico.^{1,2} No que diz respeito ao estado de oxidação, as espécies trivalentes são, aproximadamente, 60 vezes mais tóxicas que as espécies pentavalentes de As.³¹

Segundo Barra *et al.*³¹, podemos ordenar as espécies de As quanto a sua toxicidade, da seguinte forma, em ordem decrescente: Arsina (AsH₃) > Arsenito > Arsenato > ácidos orgânicos de As(III) > compostos orgânicos de As(V) > As elementar. A AsB, AsC e compostos arsenoaçúcares são classificadas como formas não tóxicas. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que as formas metiladas com estado de oxidação 3, DMA(III) e MMA(III), possuem maior toxicidade que as formas As(V), MMA(V) e DMA(V).^{37,38}

Compostos trivalentes de As inorgânico podem reagir com grupos tióis (-SH) de enzimas e proteínas, inibindo atividades biológicas. Ainda, devido a sua

semelhança química com o fósforo (P), o As(V) é reconhecido por poder substituir o P na formação de adenosina trifosfato (ATP).^{29,39}

Uma vez introduzido no organismo, o As é distribuído para todos os tecidos ou órgãos ricos em compostos com grupamentos sulfidrilas, sendo facilmente detectável em elevadas concentrações na pele, unha e cabelo.^{16,29}

Quando introduzido no organismo humano o As pode ser eliminado de forma inalterada ou ainda ser biotransformado. A biotransformação é caracterizada pelas reações de redução da espécie pentavalente *via* metilação. De forma geral, primeiramente ocorre um processo de interconversão em que o As(V) é reduzido a As(III). Posteriormente, o As(III) é metilado a MMA(V) e reduzido a MMA(III), o qual é então metilado a DMA(V). Esses metabólitos orgânicos de menor toxicidade podem, então, ser eliminados através da urina.^{16,29,40} Há indícios de que o principal órgão responsável pela biotransformação do As no organismo seja o fígado, onde a presença de um substrato, a S-adenosilmetionina, auxilia o processo de metilação.²⁹ A urina é a principal via de excreção do As, podendo então ser considerada um marcador biológico para monitoração do grau de contaminação recente do organismo por As.^{29,33}

A proporção das espécies de As que são eliminadas do organismo depende de fatores como o tempo de exposição do indivíduo ao contaminante, nível da dose e qual a forma química de As a qual o indivíduo foi exposto.^{29,32,33} Geralmente, para baixa dosagem de As, a proporção relativa das espécies de As encontradas na urina são 20-25% de As inorgânico, 15-25 % de MMA e 40-75% de DMA.⁴¹

Dado que os efeitos toxicológicos, assim como a biodisponibilidade dependem da forma química como o elemento se apresenta, a especiação química é uma ferramenta importante, fazendo-se necessário o desenvolvimento de métodos adequados de separação e detecção das espécies de As.

2.3 CONTAMINAÇÕES EM ALIMENTOS

Através da ingestão, a água e os alimentos são as mais importantes fontes de exposição humana ao As. Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estão expostas ao As, somente considerando a exposição à água.³⁰ Em locais onde não há contaminação da água pelo As, os alimentos são considerados os contribuintes majoritários para a exposição ao elemento. Um estudo realizado no norte da China

revelou que o percentual da contribuição do As foi 77% para a água, 92% para o consumo de vegetais e 32% para o de cereais.⁴²

Peixes e frutos do mar são reconhecidos por conter expressivos teores de As. Contudo, o As está presente na forma de AsB, AsC e organoaçúcares, espécies consideradas não tóxicas. Por outro lado, produtos de origem vegetal, apesar de conter menores teores de As total que os frutos do mar, podem conter maiores teores das formas mais tóxicas do elemento, as espécies inorgânicas.

Em um estudo realizado por Schoof *et al.*⁶, envolvendo a análise de 40 alimentos presentes na cesta básica dos norte-americanos, revelou que 90% dos produtos analisados contribuem para a ingestão de As inorgânico. A concentração total de As foi maior nos frutos do mar, variando de 160 ng g⁻¹ em peixes de água doce e 2.360 ng g⁻¹ em peixes oriundos de água salgada. Em contraste, a concentração de As inorgânico em frutos do mar ficou na faixa de 1 ng g⁻¹ a 2 ng g⁻¹. Maiores concentrações de As na forma inorgânica foram encontradas em arroz (74 ng g⁻¹), seguido de farinha de trigo (11 ng g⁻¹), suco de uva (9 ng g⁻¹) e espinafre (6 ng g⁻¹). Em outro estudo, foi possível observar tendência similar, onde os grãos de arroz continham concentrações de As inorgânico significativamente superiores a dos peixes (25-171 µg kg⁻¹ para arroz e < 2-18 µg kg⁻¹ para os peixes).⁴³

Assim, a contaminação pela ingestão de alimentos de origem marinha pode não ser significativa sob o ponto de vista toxicológico, uma vez que as espécies mais abundantes têm baixa toxicidade. Por outro lado, o consumo de grãos de arroz pode vir contribuir significativamente para a exposição a espécies de As de elevada toxicidade.

Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de maiores informações sobre a distribuição das diferentes espécies de As nas mais variadas matrizes alimentares, no sentido de se obter dados que possam auxiliar em tomadas de decisões importantes, no sentido de estabelecer valores de referência para cada espécie, garantindo assim uma alimentação mais segura.

2.3.1 Contaminação do arroz por As

Através de simples consulta no *site* “scopus.com” (pesquisa realizada em 20/05/2015), abrangendo o ano de 1970 até os dias atuais, 523 publicações foram encontradas a respeito da determinação de As em alimentos, sendo que em 99 delas o tema central é a determinação de As em arroz. Substituindo-se o termo “determinação” por “especificação” foram encontradas 403 publicações para alimentos e

192 para arroz. A ordem cronológica do número de publicações pode ser observada na Figura 3. Conforme é possível observar, foi crescente o interesse na análise do arroz a partir do ano de 2001, após a publicação de Schoof *et al.*⁶ Ainda, de 2007 até os dias atuais é visível o maior interesse na especiação de As em arroz, com o intuito de conhecer os diferentes níveis de concentração das espécies tóxicas de As.

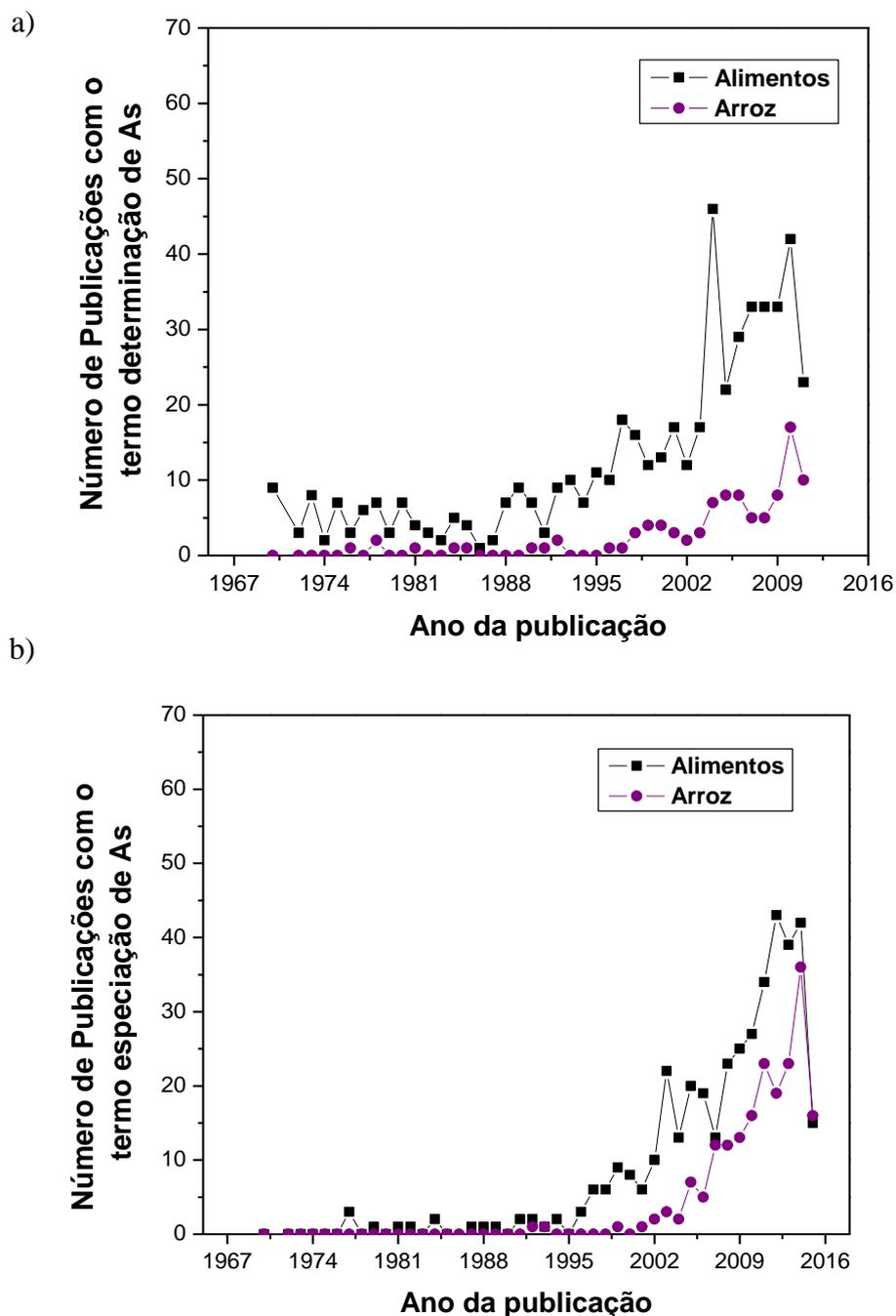


Figura 3. Evolução do número de publicações referentes à determinação de As (a) e especiação de As (b) no período de 1970 a maio de 2015.

O grande interesse pelo arroz não se deve somente à preocupação com a segurança alimentar da população, mas também ao fato que essa planta possui grande facilidade em acumular o As em seus grãos. O arroz é capaz de absorver eficientemente o As, onde a concentração desse elemento no grão de arroz pode chegar a ser 10 vezes superior quando comparada com a encontrada em outros cereais.^{2,3,44,45}

A facilidade da planta de arroz em absorver o As pode estar relacionada com o tradicional método de plantio, envolvendo a inundação contínua e controlada da cultura, onde condições anaeróbicas somadas ao excesso de água levam a uma maior mobilidade de metais e metalóides no meio e, conseqüentemente, ao acúmulo destes na planta e em seus grãos.^{4,46} Contudo, a fácil absorção do As pode ser devido às próprias características da planta, pois teores significativos de As são encontrados em arroz cultivado de modo não irrigado.⁴ Vale salientar que o grande acúmulo de As pode afetar o crescimento e desenvolvimento da planta, além de resultar na queda da produtividade da cultura⁴⁷.

A contaminação do arroz por As pode ser atribuída a condições geológicas, como a presença do contaminante de forma natural em solos, ou à ação antropogênica, com a contaminação do solo utilizado para o plantio bem como da água utilizada para irrigar a cultura, e/ou ainda pelo uso de insumos agrícolas.^{7,48,49} Vários são os estudos que relatam as elevadas concentrações de As em arroz cultivado em solos contaminados ou irrigados com água contaminada.^{7,48,49} Em um experimento realizado para avaliar o impacto do uso de água contaminada com As(V) na cultura do arroz e a absorção da espécie pelas diferentes partes da planta (casca, grão, palha, raiz), foi observado que a concentração do As(V) aumentou significativamente em todas as partes das plantas avaliadas.⁵⁰ Além disso, o aumento da concentração de As afetou o crescimento da planta, resultando em queda da produtividade. Os autores também observaram maior concentração de As na palha do arroz, que é muito utilizada para alimentação do gado, indicando uma possível ameaça direta à saúde da população através do consumo de carne bovina e laticínios. Um estudo conduzido por Talukder *et al.*⁵¹, em que água contaminada por As foi utilizada para irrigação do arroz, revelou que quando comparado com o plantio do tipo várzea, o grão de arroz produzido em sistema sequeiro continha menor concentração do As, reduzindo o nível de toxicidade. Ainda, esse sistema de plantio pode ser uma alternativa para reduzir a exposição ao As em regiões cuja concentração de As na água é alta.

A concentração de As no grão do arroz depende da variedade e do tipo de processamento ao qual o grão é submetido. Geralmente, maiores concentrações de As estão relacionadas ao arroz integral.^{4,52,53} O grão do arroz polido é o que, de modo geral, contém menores concentrações de As. Diversos estudos relatam que a casca do grão é a região em que ocorre o maior acúmulo de As, seguida do farelo, explicando a tendência observada.⁵²⁻⁵⁴

Com relação à distribuição das espécies de As no grão do arroz, as espécies presentes em maior proporção são as inorgânicas, podendo representar até 90% do teor de As total.^{5,55} Os compostos orgânicos de As presentes no arroz estão na forma de DMA e MMA, sendo que o MMA está presente em concentração muito baixa.^{8,56} Em um estudo realizado pela *Food and Drug Administration* (FDA)⁵⁷, das 1300 amostras de arroz e produtos relacionados analisados, em 97% das amostras a concentração de MMA detectada foi inferior a 13 ng g⁻¹ e somente em 1% das amostras a concentração da espécie era na faixa de 20-30 ng g⁻¹. Em outro estudo⁵⁶, das 32 amostras de arroz analisadas, oriundas de diferentes países, o MMA foi detectado somente em 13 delas, sendo a concentração máxima encontrada 7,2 ng g⁻¹.

A elevada concentração de As inorgânico encontrada no arroz pode estar relacionada à similaridade as dimensões das moléculas do As(III) e do As(V) com os transportadores de ácido silícico (Si(OH)₄) e fostato (HPO₄²⁻), respectivamente, fazendo com que a planta não seja capaz de diferenciá-los das espécies de As. Ainda, uma vez que o As(III) tem grande afinidade pelos grupos tióis, a formação de um complexo estável entre esses grupos e o As(III) pode auxiliar no acúmulo do contaminante na planta. Contudo, o mecanismo de absorção dos compostos orgânicos de As ainda não é bem compreendido.⁵⁸ Acredita-se que o MMA e DMA são absorvidos pela planta, porém as suas taxas de absorção são muito mais lentas quando comparadas àquelas dos compostos inorgânicos de As.⁵⁹

Em um estudo realizado a respeito do arroz comercializado em diferentes regiões do Brasil, os autores encontraram em média 222,8 ng g⁻¹ de As total, sendo predominantes as formas inorgânicas (As(III) e As(V)) e DMA em todas as amostras avaliadas.⁴ O estudo revelou ainda que, comparado a outros estados do Brasil, as concentrações das espécies inorgânicas de As nas amostras de arroz comercializadas no Rio Grande do Sul eram maiores.⁴ As concentrações maiores de As podem ser atribuídas à forma de cultivo do arroz, que é de modo irrigado no Rio Grande do Sul.

À medida que a extensão da contaminação do arroz por As foi evidenciada, principalmente pela forma mais tóxica (As inorgânico), e os resultados publicados, diversos países passaram a concentrar esforços no sentido de estabelecer uma concentração máxima limite de As inorgânico no arroz. Essas medidas visam assegurar a saúde da população, uma vez que o arroz é parte fundamental da dieta da população mundial. A China possui uma legislação, segundo a qual o limite máximo de As inorgânico tolerável na matriz é 200 ng g^{-1} .⁵⁶ Recentemente, o *Codex Alimentarius* (comitê sobre contaminantes em alimentos), juntamente com a FDA e a *World Health Organization* (WHO) estabeleceu 200 ng g^{-1} como a concentração máxima de As tolerável em arroz.⁶⁰ Contudo, ainda são intensas as discussões para estabelecer uma concentração limite para o As inorgânico, dado que os métodos analíticos para especiação química do As em arroz são classificados como complexos e difíceis de serem implementados em qualquer laboratório.⁵⁶ Dessa forma, é iminente a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos de As em arroz que atendam aos valores regulatórios, visando o controle na qualidade do alimento e o impacto na saúde da população.

2.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA

O conhecimento da concentração total de um dado elemento fornece informações limitadas no que diz respeito a danos ao meio ambiente ou à saúde, uma vez que diferentes espécies químicas podem ter diferente biodisponibilidade, mobilidade e impacto, tanto ambiental quanto toxicológico. A importância da análise de especiação química de As é refletida no crescente número de publicações a respeito do assunto e o progresso alcançado com o desenvolvimento de técnicas que permitem a separação e detecção de espécies químicas em baixa concentração. Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), espécie química é definida como a forma específica de um elemento químico quanto a sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou estrutura molecular; a análise de especiação química constitui-se na atividade analítica de identificar e/ou quantificar uma ou mais espécies.⁶¹

A análise de especiação química engloba duas técnicas complementares, uma delas para separação eficiente das espécies químicas e a outra para detecção e/ou quantificação do elemento. Por ser fundamental na avaliação de risco de um dado

elemento, o desenvolvimento de métodos precisos e seletivos para a determinação das diferentes espécies de As é de extrema importância para uma estimativa realista do risco toxicológico ou do comportamento do As no ambiente.

2.4.1 Métodos de extração das espécies de As

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de espécies químicas não é trivial. Cuidados para que não ocorra interconversão das espécies devem ser tomados, desde o processo de amostragem, método de extração, separação e quantificação do analito.

Como a maioria das amostras nas quais se pretende determinar as espécies químicas presentes encontra-se no estado sólido, o tratamento da amostra e a etapa de extração são cruciais para manter a integridade das espécies, principalmente quando o objetivo é quantificar cada uma delas.⁶² O tipo de solvente extrator, a técnica de extração, o tempo e a temperatura são alguns dos parâmetros que devem ser considerados no procedimento de extração.^{2,43}

Procedimentos para a análise de especiação química de As em arroz, com preservação das espécies, foram desenvolvidos. Como meio extrator, foram geralmente utilizadas soluções ácidas diluídas sob aquecimento brando, nunca superior a 100 °C.^{2,5,46,55,56} De forma geral, independentemente do método de extração utilizado, as suspensões obtidas das amostras foram centrifugadas e filtradas para posterior determinação das espécies de interesse.^{3,5,9,43,56,63}

Para a determinação das espécies de As presentes em arroz comercializado na Itália, Sommella *et al.*³ utilizaram ácido nítrico (HNO₃) 1% (v/v) como meio extrator. A amostra ficou em repouso em contato com a solução ácida diluída por um período de 12 horas (“*overnight*”) e posteriormente as espécies de As foram extraídas com o auxílio de radiação micro-ondas. Método similar de preparo da amostra também foi utilizado por Sun *et al.*⁵, porém foi excluída a etapa de repouso. Reys *et al.*⁶⁴ avaliaram diversos meios extratores e sugeriram o emprego de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1 mol L⁻¹ e radiação micro-ondas para extração das espécies de As. Segundo os autores, o método de extração garantiu recuperação quantitativa dos analitos, sem a interconversão das espécies. Ácido trifluoroacético (CF₃CO₂H) e água também foram sugeridos para extração de As em arroz.⁴³ Contudo, Huang *et al.*² evidenciaram que os métodos de preparo da amostra de arroz sugeridos na literatura para análise de especiação química de As não levavam em consideração as variedades e os tipos do

cereal. Por causa disso, os autores propuseram o uso de HNO_3 $0,28 \text{ mol L}^{-1}$, com aquecimento a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 95 minutos, como um método simples e eficiente, garantindo a integridade das espécies de As, independentemente da variedade e do tipo do arroz analisado. Esse método foi adotado pela FDA para extração das espécies de As em arroz e posterior determinação das mesmas por HPLC-ICP-MS.⁶⁵

A adição da mistura HNO_3 1% (v/v)/ H_2O_2 1% (v/v) e radiação micro-ondas também foram sugeridas para extração de As inorgânico em arroz.^{10,56,63} Chen *et al.*¹⁰ aplicaram o método de extração para amostras de arroz e material de referência certificado - para As inorgânico em arroz (ERM-BC-211) - onde o valor encontrado foi concordante com o valor certificado.

Recentemente, Narukawa *et al.*⁹ avaliaram a eficiência de diferentes soluções de HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , HClO_4 , H_2O_2 , HBr , H_3PO_4 , ácido fórmico, hidróxido de tetrametilamônio e NH_4NO_3 para extração de espécies de As presentes em arroz. Os autores observaram que em meio fortemente ácido era favorecida a redução de As(V) a As(III) e em condições neutras o As(III) não era totalmente extraído da matriz. Além disso, os autores observaram que a concentração do DMA não era alterada frente aos diferentes meios extratores. O uso de HClO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ou HNO_3 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de $5000 \text{ } \mu\text{g}$ de Ag (para evitar a redução de As(V) a As(III)) permitiu a extração das espécies de As em arroz, mantendo a integridade das mesmas.

Uma vez estabelecido o procedimento de extração, para garantir a exatidão e precisão dos resultados é importante a análise de materiais de referência certificados (CRMs). Contudo, a maior dificuldade em estabelecer um método analítico para a especificação química está relacionada à escassez de CRMs para as diferentes espécies químicas de um elemento. Com respeito ao arroz, o *National Institute of Standards and Technology* (NIST) oferece o *CRM Rice Flour 1568a*. Apesar de o material possuir apenas o valor certificado para a concentração de As total, em muitos estudos houve um consenso quanto às concentrações das espécies As(III), As(V), MMA e DMA.^{4,5,10,43,56,63,64,66,67} Recentemente, o *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) desenvolveu um CRM para a matriz de arroz (ERM B211), onde foram certificadas as concentrações do As inorgânico ($124 \pm 11 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), DMA ($119 \pm 13 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e As total ($260 \pm 13 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), que viabilizam o desenvolvimento e implementação de métodos analíticos para análise de especificação química de As em arroz. Apesar desse avanço obtido, ainda é necessário o desenvolvimento de CRM

com as concentrações certificadas das duas espécies de As inorgânico (As(III) e As(V)), uma vez que essas estão suscetíveis à redução/oxidação.⁸

2.4.2 Separação e quantificação das espécies de As

A determinação quantitativa das diferentes espécies de As requer prévia separação das mesmas e um sistema de detecção suficientemente sensível. Nas duas últimas décadas houve progresso significativo na análise de especiação química mediante técnicas cromatográficas de separação. Técnicas como a HPLC hifenada com técnicas de detecção de alta sensibilidade como a AFS e ICP-MS permitem a determinação de várias espécies de As em baixas concentrações.

O uso da cromatografia líquida possibilita a separação de espécies de As sem uma etapa prévia de derivatização.³¹ A HPLC associada com a HG-AAS ou HG-AFS já foi usada para análise de especiação química de As.⁶⁸ A técnica HPLC-ICP-MS tem sido amplamente utilizada para análise de especiação química de As em arroz, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas.^{2,4,8,9}

Apesar de essas técnicas hifenadas estarem associadas à elevada sensibilidade, baixos limites de detecção (LD) e detecção seletiva, podem apresentar algumas desvantagens, como complexidade, instabilidade do plasma causada por solvente orgânico (fase móvel) ou ainda interferências pela formação de íons poliatômicos interferentes, no caso da técnica ICP-MS.⁶⁹ Além disso, são técnicas de elevado custo operacional, que exigem maior experiência e conhecimento do analista, sendo mais difíceis de serem utilizadas rotineiramente.

A análise de especiação química sem o uso de um cromatógrafo para a separação das espécies químicas é possível e oferece algumas vantagens frente ao tradicional método de separação cromatográfica, como simplicidade, baixo custo e robustez. Mesmo que a separação das espécies seja limitada, uma vez que são obtidas informações para um menor número de espécies, pode oferecer suficiente informação para uma avaliação de risco das espécies mais tóxicas do elemento, como é o caso das espécies inorgânicas do As.^{70,71}

Materiais como nanofibras e membranas funcionalizadas podem ser utilizadas para pré-concentrar e separar seletivamente as espécies de As.⁷²⁻⁷⁴ Para a determinação de As inorgânico em água, Li *et al.*⁷⁴ desenvolveram um sistema de microextração adaptado a um equipamento de ICP-MS.⁷⁴ O sistema consistiu na utilização em linha de duas microcolunas recobertas com N-(β -aminoetil)- γ -aminopropiltriétoxissilano

(AEAPTES) para adsorção seletiva do As(V). Na primeira coluna foi extraído quantitativamente e seletivamente o As(V), deixando passar o As(III). Em seguida, ao passar por uma zona de oxidação contendo KMnO_4 , o As(III) era oxidado a As(V), sendo extraído e retido na segunda coluna. OLD foi 5 ng L^{-1} de As(V) e o método foi aplicado com sucesso para amostras aquosas e CRMs de água. Rasmussen *et al.*⁷² separaram seletivamente o As inorgânico presente no arroz através de extração em fase sólida (SPE), em uma coluna de troca iônica, sendo o As posteriormente determinado mediante HG-AAS. O LD obtido para As inorgânico foi $20 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Procedimento similar foi utilizado por Chen e Chen⁷³ para a determinação de As inorgânico em arroz mediante HG-AFS, com adequado LD ($1,3 \text{ ng g}^{-1}$ para As inorgânico), além de ser encontrada concentração de As inorgânico concordante com a certificada em arroz.

Outra alternativa frente ao uso de cromatógrafo é a associação da geração de hidretos com a técnica de espectrometria de absorção atômica (HG-AAS), que garante sensibilidade adequada para a determinação de As em baixas concentrações. O método permite ainda a quantificação individual dos hidretos de diferentes espécies de As, uma vez que as diferentes espécies possuem diferente reatividade e sensibilidade frente ao agente redutor (NaBH_4). A técnica HG-AAS é considerada mais simples que a HPLC-ICP-MS; a HG-AAS ainda é a mais popular e preferida em termos de simplicidade, seletividade, rapidez e menor custo para a determinação de As.

2.5 GERAÇÃO DE HIDRETOS (HG)

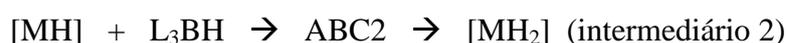
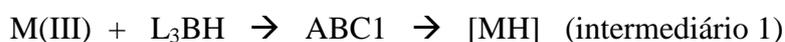
A derivatização por HG e subsequente determinação do hidreto na fase gasosa é o método ainda mais utilizado para determinação de As. Conforme já mencionado, isso se deve à relativa simplicidade, baixo custo operacional e suficiente sensibilidade. A HG envolve a conversão do analito presente na amostra líquida em um composto volátil através de uma reação com um agente redutor. Após a separação do hidreto volátil na solução em um separador gás-líquido, ele é transferido com o auxílio de um gás carreador para uma cela de atomização ou ICP, sendo posteriormente detectado o elemento correspondente.

Comumente, como agente redutor para a geração do hidreto são utilizados sais de tetrahidroborato, como o de sódio (NaBH_4), em meio ácido. O uso do NaBH_4 como redutor diminui o sinal do branco, garante a obtenção de sinais mais reprodutíveis e

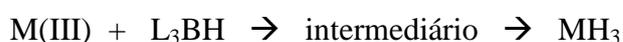
diminui o tempo de reação, devido a sua elevada reatividade.^{31,75} Contudo, por ser instável, a solução do redutor deve ser preparada e utilizada dentro de algumas horas. Para aumentar a estabilidade, a solução de NaBH₄ é preparada em KOH ou NaOH 0,05-2% (m/v).⁷⁵

O mecanismo envolvido na reação de geração do hidreto é complexo. O hidreto é gerado a partir da transferência do hidrogênio ligado diretamente ao boro (B).⁷⁶ Isso ocorre pela formação de complexo intermediário entre o analito e o tetrahidroborato, confirmado experimentalmente pelo uso de reagentes deuterados.⁷⁷ Existem duas hipóteses para o processo:

- i) Os átomos de hidrogênio presentes no hidreto final são oriundos de diferentes moléculas do tetrahidroborato⁷⁶



- ii) Os átomos de hidrogênio presentes no hidreto final são oriundos da mesma molécula de tetrahidroborato⁷⁶



onde L = H⁺, H₂O ou OH⁻.

Dentre as principais vantagens associadas à HG podemos destacar a separação do analito da matriz, a elevada eficiência do transporte do analito para o atomizador (podendo atingir 100%), a melhor sensibilidade e melhores LDs em comparação com a nebulização pneumática.^{75,78} Além disso, a HG pode ser associada a sistemas de detecção, permitindo a análise de especiação química. Contudo, a técnica possui algumas limitações. A presença de constituinte da amostra, o pH e concentrações dos reagentes podem interferir na geração ou liberação do hidreto.^{75,78} Ainda, a eficiência na geração de hidretos pode ser diferente para cada espécie, dependendo do estado de oxidação da espécie. Isso pode ser contornado através do uso de agentes oxidantes (como o H₂O₂) ou através de uma etapa prévia de redução do analito por ácido ascórbico/iodeto de potássio ou L-cisteína.^{56,75} Uma vez que em estado de oxidação mais alto a cinética de geração do hidreto é mais lenta, tal característica pode ser útil

na análise de especiação química, possibilitando a determinação seletiva de espécies de elementos formadores de hidretos.

2.5.1 Análise de especiação química de As baseada na HG

A geração de hidretos de As(III) e As(V) é criticamente dependente do estado de oxidação do elemento e, de modo geral, a espécie de menor estado de oxidação gera o hidreto com maior eficiência. Esse comportamento deve-se à lenta cinética de conversão do As(V) para As(III).⁷⁵

Além da geração da arsina (AsH₃), o NaBH₄ pode converter as espécies orgânicas de As em hidretos voláteis, formando assim a monometilarsina (CH₃AsH₂) e dimetilarsina ((CH₃)₂AsH), provenientes do MMA e DMA, respectivamente.

A geração dos hidretos de As é fortemente dependente do pH. Em ambiente fortemente ácido (pH entre 0 e 1,5) os hidretos são gerados a partir de espécies orgânicas e inorgânicas de As, independentemente do seu estado de oxidação.⁷⁵ Por outro lado, em pH próximo da neutralidade (6 - 7) são gerados hidretos somente a partir de espécies trivalentes de As.⁷⁵ Foram publicados trabalhos que citam o uso de soluções tampão para a determinação seletiva das espécies de As.⁷⁹⁻⁸¹ Em um estudo realizado por Matoušek *et al.*⁷⁹, o emprego de solução tampão Trizma[®] 0,75 mol L⁻¹ a pH 6 permitiu que os hidretos fossem gerados somente a partir das espécies trivalentes de As. Ainda, a adição do pré-redutor L-cisteína 2% (m/v) às soluções das amostras permitiu a geração de hidretos a partir de As em estado trivalente e pentavalente, sendo a concentração de As pentavalente obtida por diferença.

A concentração de ácido (HCl - este é usado por deixar o meio redutor) também é um fator importante na geração dos diferentes hidretos de As. Em condições fortemente ácidas o As(V) é reduzido eficientemente a As(III) e assim gerada a arsina. No entanto, nessa condição, a eficiência da geração dos hidretos das espécies MMA e DMA cai drasticamente.^{10,56,63,82} Na presença de altas concentrações de HCl essas espécies são protonadas e, portanto, não propensas à formação de hidretos, permanecendo em solução.⁶³ Quando utilizado o mesmo meio reacional para as quatro espécies de As, diferentes respostas são obtidas frente à eficiência na geração de hidretos. Conseqüentemente, a geração de hidretos permite, mediante otimização das condições reacionais, como a concentração do ácido (HCl) e do NaBH₄, a geração seletiva de hidretos a partir das espécies de As.

A geração seletiva de hidretos já foi aplicada para a análise de especiação química de As em alimentos, água e tecido biológico.^{10,56,63,82,83} Shraim *et al.*⁸² avaliaram e otimizaram as condições reacionais para a geração seletiva dos hidretos de As(III), As(V), MMA e DMA em amostras de água⁸². A concentração de HCl variou de 0,01 a 6,0 mol L⁻¹ e a de NaBH₄ variou de 0,05 a 2% (m/v), dependendo da espécie. Recuperações quantitativas (102-114%) foram obtidas nos testes de adição do analito e os LDs determinados foram 1,1; 0,5; 0,6 e 1,8 µg L⁻¹ para As total, DMA, As(III) e MMA, respectivamente. Reys *et al.*⁶⁴ desenvolveram um método para a determinação de As(III), As(V), MMA e DMA em amostras de vegetais e cereais através da HG-AFS. O desenvolvimento do método consistiu no uso de uma série de equações proporcionais correspondentes a quatro diferentes condições experimentais para a geração dos hidretos.

A geração seletiva de hidretos para a determinação de As inorgânico em arroz tem sido proposta.^{10,56,63} O uso de HCl 5 mol L⁻¹ e NaBH₄ 2% (m/v) permitiu a geração seletiva de As inorgânico no arroz.⁵⁶ Uma vez que a eficiência da redução é diferente para as duas espécies inorgânicas (As(III) e As(V)), a extração foi realizada em meio oxidante, na presença de H₂O₂ para oxidar o As(III) a As(V). Os autores ainda compararam os resultados obtidos pelo método proposto e os obtidos mediante HPLC-ICP-MS, não sendo encontradas diferenças significativas entre os dois métodos de determinação do As inorgânico. Desse modo, o método proposto é uma alternativa simples frente ao uso do HPLC, com um LD adequado (5 ng g⁻¹ de As inorgânico). Condições idênticas também foram utilizadas por Musil *et al.*⁶³ para a determinação de As inorgânico em arroz e alga por HG-ICP-MS, sendo o LD 1,1 ng g⁻¹ de As inorgânico. Chen *et al.*¹⁰ também propuseram a técnica HG-AFS para a especiação química de As em arroz. As condições para geração de hidreto foram HCl 4,8 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,7% (m/v), sendo o LD 1 ng g⁻¹ de As inorgânico. Os autores também analisaram arroz certificado, cujos resultados obtidos para As inorgânico foram concordantes com o valor certificado.

As técnicas HG-AFS ou HG-ICP-MS são operacionalmente mais simples do que HPLC-ICP-MS, podendo as duas primeiras garantir uma maior velocidade de análise, além de serem mais adequadas para análises de rotina. Contudo, a técnica HG-AAS ainda é a mais utilizada para a determinação de As, haja vista a maior versatilidade da AAS frente à AFS e o menor custo da AAS quando comparada com ICP-MS. No entanto, o uso da HG-AAS para a determinação de As inorgânico em

arroz foi até hoje proposta somente por Rasmussen *et al.*⁷². O método desenvolvido pelos autores envolveu a separação do As inorgânico por SPE, sendo então as espécies eluídas da coluna e o As determinado por HG-AAS. Contudo, neste caso, não foi utilizada a geração seletiva de hidretos para a separação das espécies de As. Com isso, entende-se que o desenvolvimento de métodos de determinação de As inorgânico em arroz através de instrumentação de baixo custo como a HG-AAS são necessários.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise de especiação química de As inorgânico em arroz, utilizando-se a HG-AAS.

Para alcançar o objetivo, o trabalho foi estruturado conforme segue:

- 1) Estudo da separação das espécies inorgânicas As(III) e As(V) mediante geração seletiva de hidretos;
- 2) Estudo da extração das espécies de As no arroz;
- 3) Avaliação da exatidão do método para detecção e quantificação do As inorgânico em arroz por HG-AAS;
- 4) Determinação de As total nas amostras de arroz.
- 5) Determinação das concentrações de As(III) e As(V) em amostras de arroz produzidas e comercializadas no Estado do Rio Grande do Sul.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de As foi realizada com o uso de um espectrômetro de absorção atômica (Analyst 200 da PerkinElmer) equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo, em conjunto com o sistema de injeção em fluxo comercial FIAS 100 (PerkinElmer). A introdução de ar no separador gás líquido foi feita com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson). O atomizador utilizado foi uma cela de quartzo convencional, eletricamente aquecida a 900 °C.

Como fonte de radiação foi utilizada uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL), operada a 400 mA. O comprimento de onda selecionado foi 193,7 nm, sendo 0,7 nm a largura da fenda. Todas as medidas foram obtidas em absorbância integrada. O sistema utilizado para a geração dos hidretos de As é esquematizado na Figura 4.

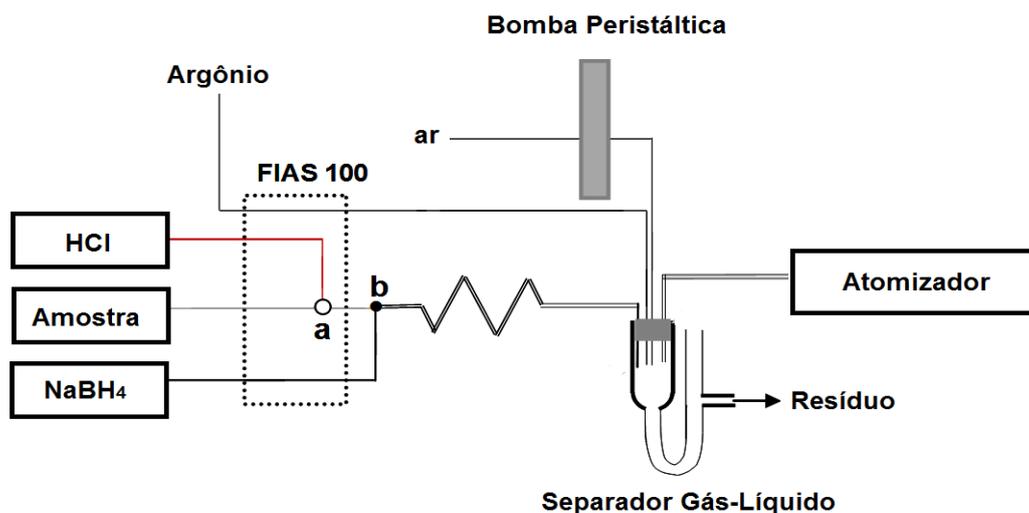


Figura 4. Representação esquemática do sistema utilizado para a geração de hidretos e posterior detecção do As por HG-AAS. Carreador: HCl (4 mL min⁻¹); agente redutor: NaBH₄ (4 mL min⁻¹); alça de amostragem: 250 µL; gás de arraste: argônio (50 mL min⁻¹); vazão de ar introduzido no separador-gás líquido: 1,65 mL min⁻¹.

Conforme o esquema mostrado na Figura 4, a amostra entra inicialmente em contato com o carreador (HCl) através da válvula **a** e posteriormente é misturada com

o agente redutor (NaBH_4) na confluência **b**. A mistura reacional é então conduzida para o separador gás-líquido onde o argônio (Ar) auxilia no transporte dos hidretos voláteis até o atomizador. O resíduo é removido do separador gás-líquido por gravidade. No arranjo instrumental mostrado Figura 4, tubos de Tygon vermelho-branco foram utilizados para a propulsão das soluções de HCl e NaBH_4 , enquanto que um tubo de Tygon preto-preto foi utilizado para a introdução de ar para dentro do separador gás-líquido. Um tubo de politetrafluoretileno (PTFE) de 100 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno foi utilizado para transportar a solução da confluência **b** para o separador de gás-líquido. O separador gás-líquido, em forma de U, foi desenvolvido no próprio laboratório. O uso desse separador gás-líquido garantiu que não houvesse efervescência excessiva durante a geração dos hidretos, o que poderia resultar na transferência de água para a cela de atomização e no aumento do ruído.

Um forno micro-ondas (Berghof, Seedwave 4) foi empregado para a extração das espécies de As e a digestão ácida do arroz. A extração alcalina do As no arroz, para a posterior determinação do As total por HG-AAS, foi realizada através de aquecimento em placa metálica (modelo Ika-Works RH basic1). A separação das fases da suspensão de arroz foi feita com o auxílio de uma centrífuga (Fanem modelo Baby 206). Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica digital (Shimadzu, modelo AUY220), com precisão de 0,0001g.

A determinação de As total por ICP-MS (ELAN[®] DRC II (PerkinElmer/SCIEX)) foi realizada no laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Água desionizada e purificada (em sistema Milli-Q, Millipore) com resistividade final de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm foi utilizada no preparo de todas as amostras e soluções. Ácido clorídrico (HCl , 37% m/m), ácido nítrico (HNO_3 , 65% m/m) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30% m/m) de grau analítico (Merck) foram utilizados.

Soluções de tetrahidroborato de sódio foram preparadas diariamente a partir de NaBH_4 (99% puro, Acros Organics) e estabilizadas em NaOH 0,01% (m/v, Merck). Para a extração do As total no arroz, persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Synth) foi utilizado como agente oxidante. Para a redução das espécies pentavalentes de As,

ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$, Nuclear) e iodeto de potássio (KI, Vetec) ou L-cisteína ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl$, Merck) foram utilizados.

Uma solução estoque contendo 100 mg L^{-1} de As(III) foi obtida através da dissolução de As_2O_3 (Merck) em água previamente sonicada. A sonicação foi realizada para a remoção de oxigênio dissolvido, prevenindo assim uma possível oxidação do As(III). Soluções estoque contendo 1000 mg L^{-1} de MMA ($Na_2CH_3O_3 \cdot As \cdot 6H_2O$, Chem Service) e 10 mg L^{-1} ($C_2H_6AsO_2Na$, Sigma Aldrich) foram fornecidas pelo Prof. Valderi L. Dressler da Universidade Federal de Santa Maria.

Uma solução contendo 5% (m/v) de KI e 1% (m/v) de ácido ascórbico foi preparada em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ imediatamente antes do uso, para a pré-redução do As(V) a As(III) na determinação do As inorgânico. Essa solução foi adicionada às soluções de calibração e amostras e, após um período de 30 minutos de repouso, as mesmas foram diluídas, obtendo-se soluções onde as concentrações finais de KI, ácido ascórbico e HCl eram de 1% (m/v), 0,2% (m/v) e $0,24 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Uma solução de L-cisteína 2% (m/v) foi preparada pela sua dissolução do reagente em água.

As soluções de calibração de As(III) foram preparadas em HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ a partir da diluição da solução estoque de As(III). Para a determinação de As inorgânico, as soluções de calibração de As(V) foram preparada em HCl $0,24 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KI 1% (m/v) e ácido ascórbico 0,2% (m/v), através de adequada diluição da solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de As(V). Esta solução estoque era proveniente da Merck (Titrisol[®]). A faixa de concentração das soluções de calibração de As(III) e As(V) variou de $0,5 - 8,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na determinação de As total as soluções de calibração foram preparadas em $K_2S_2O_8$ 0,4% (m/v) e HNO_3 1% (v/v), a partir de diluições da solução estoque de As(V). Nesse caso, a faixa de concentração das soluções de calibração variou de $0,5 - 12 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.1 Limpeza do material

Os frascos de polipropileno utilizados para armazenamento das amostras e vidraria em geral foram descontaminados em HNO_3 10% (v/v) e HNO_3 50% (v/v), respectivamente, por um período mínimo de 48 horas. Transcorrido esse período, foram enxaguados com água ultrapura e deixados secar à temperatura ambiente. A limpeza da cela de atomização consistiu na imersão da mesma em uma solução de

HNO₃/HF, na proporção 7:3, por 10 minutos, sendo em seguida enxaguada com água ultrapura e deixada secar à temperatura ambiente. Foram utilizadas duas celas de quartzo; uma para As(III) e As total e outra para As inorgânico, após pré-redução do As(V). Foram utilizadas duas células porque a sensibilidade mudava após a determinação de As em solução redutora (KI + ácido ascórbico).

4.3 AMOSTRAS

As amostras de arroz foram adquiridas no comércio local (feiras e supermercados de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul), compreendendo diferentes tipos e variedades de arroz. As amostras analisadas são citadas na Tabela I. Cerca de 50 g de cada amostra foram cominuídas em gral de ágata e peneiradas para obtenção de partículas com diâmetro < 0,08 mm, em peneira de nylon construída no próprio laboratório.

Para avaliar a exatidão do método foram analisadas duas amostras de farinha de arroz certificadas - NIST 1568a (do *National Institute of Standards and Technology*) e ERM-BC211 (do *European Reference Materials*).

Tabela I. Relação das amostras de arroz analisadas.

Variedade do Arroz	Tipo de Processamento
Agulha	Integral
Agulha	Orgânico parboilizado
Agulha	Orgânico polido
Agulha	Parboilizado
Agulha	Polido
Agulhinha	Polido
Arbóreo	Polido
Cateto	Biodinâmico orgânico integral
Cateto	Integral
Cateto	Orgânico integral
Cateto	Orgânico polido
Cateto	Polido
Vermelho	Integral

4.3.1 Preparo da amostra para a determinação de As total

A extração alcalina foi utilizada com o intuito de se determinar o As total. Neste caso, cerca de 250 mg da amostra de arroz cominuído foram exatamente pesados e transferidos para frasco graduado de vidro, ao qual foram adicionados 1 mL de HNO₃ 10% (v/v) e 2 mL de solução de K₂S₂O₈ 2% (m/v). A mistura foi aquecida em banho-maria em placa de aquecimento a 80 - 90°C por 3 horas. Após esse período, a mistura foi deixada esfriar à temperatura ambiente e em seguida o seu volume foi elevado a 10 mL pela adição de água. Na etapa seguinte, a mistura foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante reservado para posterior determinação do As total por HG-AAS.

Quatro amostras de arroz foram submetidas ao processo de digestão ácida em forno micro-ondas, para determinação de As total mediante ICP-MS, como uma técnica independente, para validar o método de extração alcalina. Para isso, a 250 mg da amostra foram adicionados 3 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂, conforme método sugerido pelo fabricante do forno micro-ondas.⁸⁴ Os frascos foram introduzidos no forno e as amostras submetidas ao programa de aquecimento (detalhado na Tabela II). A solução obtida foi transferida quantitativamente para frasco graduado de polipropileno e o volume completado a 15 mL.

Tabela II. Programa do forno micro-ondas utilizado para digestão ácida do arroz.

Etapa	T (°C)	P (bar)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Potência (%)
1	160	30	10	15	70
2	180	35	5	15	90
3	50	25	1	10	0

4.3.2 Procedimento de extração para especiação química de As

Para a extração das espécies de As seguiu-se a metodologia proposta por Calle *et al.*⁸⁵. Desta forma, 5 mL de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ foram adicionados a 500 mg de amostra e a mistura mantida em repouso por 12 horas (“*overnight*”). Transcorrido esse período, as espécies de As foram extraídas mediante a aplicação de radiação micro-ondas (o programa do forno é detalhado na Tabela III). Após ser atingida a

temperatura ambiente, a suspensão obtida foi transferida para frasco de polipropileno graduado e o volume completado a 14 mL com HNO_3 $0,14\text{mol L}^{-1}$. A suspensão final foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi reservado para posterior análise do As(III) e As inorgânico.

Tabela III. Programa do forno micro-ondas utilizado para extração das espécies inorgânicas (As(III) e As(V)) presentes nas amostras de arroz.

Etapa	T (°C)	P (bar)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Potência (%)
1	55	25	1	2	0
2	75	30	2	10	60
3	95	35	2	30	80

Outros três métodos de extração das espécies de As, sugeridos na literatura pertinente (Tabela IV), foram avaliados a fim de se comparar os resultados obtidos.

Tabela IV. Procedimentos de preparo da amostra avaliados para a análise de especiação química de As em arroz.

Método	Meio extrator	Procedimento	Referência
1	HNO_3 $0,28\text{ mol L}^{-1}$	250 mg de amostra + 5 mL do extrator; mistura aquecida a $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 min em banho-maria.	2
2	HClO_4 $0,05\text{ mol L}^{-1}$	500 mg de amostra + 2 mL do extrator; mistura aquecida a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas em banho-maria.	9
3	HNO_3 1% (v/v) + H_2O_2 1% (v/v)	500 mg de amostra + 2 mL do extrator; mistura submetida a radiação micro-ondas.	56

O método 1 (Tabela IV) foi o proposto por Huang *et al.*², em que 250 mg de amostra foram pesados e transferidos para frasco de polipropileno graduado ao qual foram adicionados 5 mL de HNO_3 $0,28\text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi aquecida a $95\text{ }^\circ\text{C}$ por

um período de 90 minutos em banho-maria, em copo de béquer sobre chapa de aquecimento. Depois de atingida a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante reservado para determinação de As(III) e As inorgânico. O método 2, sugerido por Narukawa *et al.*⁹, consistiu na adição de 2 mL de HClO₄ 0,05 mol L⁻¹ a 500 mg de amostra. A mistura foi aquecida a 100 °C por 2 horas em banho-maria, em copo béquer sobre chapa de aquecimento. Depois de atingida a temperatura ambiente, o volume da mistura foi completado a 14 mL com água e a suspensão final centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi reservado para posterior determinação do As(III) e As inorgânico. O método 3 foi proposto por Petursdottir *et al.*⁵⁶, o qual consistiu na extração do As inorgânico presente no arroz. Neste caso, 5 mL de HNO₃ 1% (v/v) e H₂O₂ 1% (v/v) foram adicionados a 500 mg de amostra. A mistura foi submetida à radiação micro-ondas (5 min. a 50°C; 5 min. a 75°C e 30 min. a 95°C). Após ser atingida a temperatura ambiente, a suspensão obtida foi transferida para frasco de polipropileno graduado e o volume completado a 14 mL com água. A suspensão final foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi reservado para posterior determinação do As inorgânico.

5. RESULTADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE HG-AAS PARA DETERMINAÇÃO DE As

5.1.1 Efeito da adição de ar no separador gás-líquido

Primeiramente, testes foram realizados com o intuito de encontrar as melhores condições para a determinação de As por HG-AAS. Os testes preliminares revelaram pouca sensibilidade e precisão. Sendo assim, ar foi introduzido no separador de gás-líquido, a fim de melhorar estes parâmetros e com isso aumentar a quantidade de O₂ no gás carreador, favorecendo a produção de radicais no interior da cela de quartzo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.

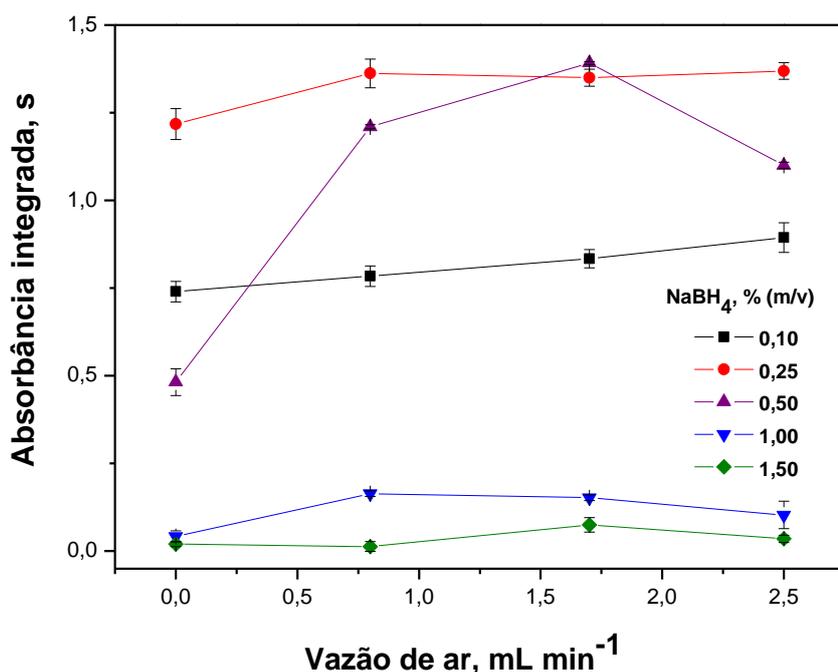


Figura 5. Influência do ar introduzido no separador gás-líquido na absorvância do As(III), na concentração de 10 µg L⁻¹. O carreador da amostra foi HCl 1 mol L⁻¹. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

Como pode ser observada na Figura 5, a absorvância aumentou mais do que três vezes com a adição de ar quando a concentração de NaBH_4 foi 0,5% (m/v) e vazão de ar $1,65 \text{ mL min}^{-1}$. Desta forma, o desvio-padrão relativo (RSD) de 10 medidas foi inferior a 5%. No entanto, para concentrações mais baixas de NaBH_4 , o efeito do ar foi menos pronunciado ou inexistente.

A atomização de hidretos numa cela de quartzo aquecida ocorre através de colisões com radicais livres de H, que podem ser formados por decomposição de moléculas de hidrogênio. A melhor atomização dos hidretos em presença de radicais H tem sido relatada por Dědina em várias publicações.⁸⁶⁻⁸⁸ Os radicais são formados através de reações entre o hidrogênio e oxigênio, a partir da decomposição do NaBH_4 e dos contaminantes presentes nos reagentes.

O oxigênio presente no ar pode aumentar a produção de radicais livres de H e assim, aumentar a absorvância do As, como observado na Figura 5. A diminuição da absorvância observada quando a vazão do ar era maior que $1,65 \text{ mL min}^{-1}$ deve-se, possivelmente, pelo consumo de hidrogênio.⁸⁹ Dois processos estão relacionados com a diminuição de átomos livres do analito no interior da cela de quartzo. Um deles é um processo mecânico baseado no escoamento do gás de transporte, que empurra os átomos livres para as partes externas da cela de quartzo. O outro processo está relacionado com reações químicas que ocorrem ao longo do atomizador (significativamente influenciadas pela superfície interna quartzo). O mecanismo de radicais livres de H explica satisfatoriamente o aumento da absorvância com o aumento da vazão de ar, no caso do uso de NaBH_4 0,5% (m/v). No entanto, a redução dos átomos livres do analito não foi ainda totalmente elucidada.^{86,90}

Após avaliada a influência do ar adicionado ao separador gás-líquido, a vazão de $1,65 \text{ mL min}^{-1}$ foi fixada. Além disso, concluiu-se que investigações adicionais são necessárias para melhor entender o efeito do ar introduzido no separador gás-líquido, como o observado na Figura 5.

5.1.2 Efeito do gás de arraste

A influência da vazão de argônio (Ar) introduzido no separador gás-líquido para o transporte do hidreto até o atomizador foi avaliada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.

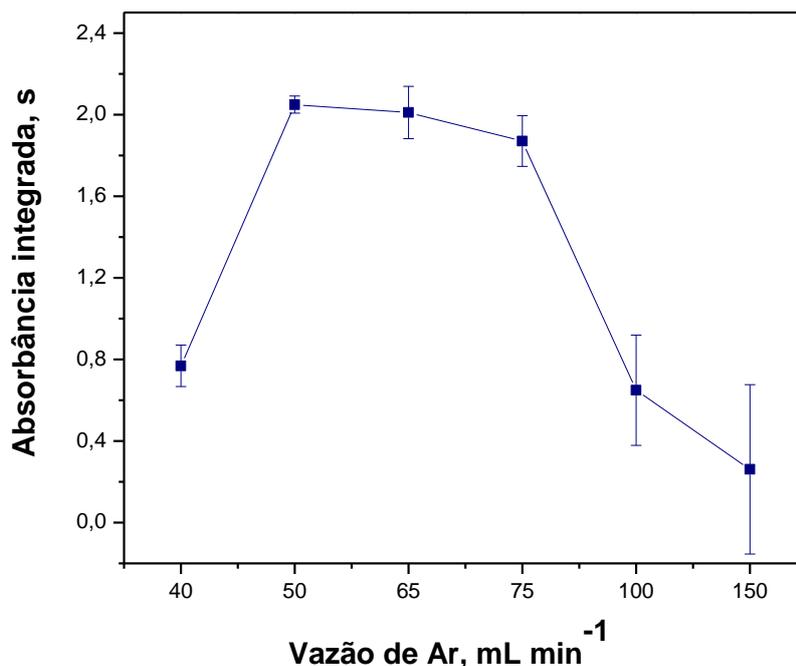


Figura 6. Efeito da vazão do gás de arraste na absorbância integrada do As(III) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições: NaBH_4 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L^{-1} . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

O aumento da absorbância em função do aumento da vazão do gás de arraste, de 40 para 50 mL min^{-1} , deve-se a melhor eficiência na separação do hidreto presente na solução, ou seja, ao melhor transporte do hidreto para a cela de atomização. Contudo, em vazões superiores a 75 mL min^{-1} uma queda significativa do sinal analítico é observada. Esse comportamento está associado com a maior diluição do hidreto no atomizador, ocasionado pela diminuição da nuvem atômica na cela de quartzo, além da inadequada integração do sinal obtido. Sendo assim, a vazão de

50 mL min⁻¹ foi escolhida levando-se em consideração a sensibilidade e precisão do sinal analítico obtido.

5.1.3 Efeito da alça de reação

O comprimento da alça de reação é um fator importante, uma vez que ela promove a mistura do NaBH₄ e HCl para a geração dos hidretos. Foram testadas duas alças de reação com diferentes comprimentos. Na Tabela V são apresentados os resultados obtidos.

Tabela V. Valores de absorbância obtidos para as alças de reação com diferentes comprimentos. Foram utilizados HCl 1 mol L⁻¹, NaBH₄ 0,5% (m/v) e solução contendo 25 µg L⁻¹ de As(III). Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

	Comprimento da Alça de Reação	
	15 cm	100 cm
Absorbância integrada, s	1,766	2,243 ^a
Desvio padrão	0,091	0,049
Desvio padrão relativo, %	5,18	2,23

Segundo os resultados apresentados na Tabela V, observa-se que foi obtida uma melhor resposta, em termos de sensibilidade e precisão, quando utilizada a alça com 100 cm de comprimento, a qual então foi selecionada para a continuidade do trabalho. A pior resposta obtida quando utilizada a alça com 15 cm de comprimento está associada ao curto espaço para promover a mistura reacional, diminuindo a eficiência na geração do hidreto.

5.1.4 Efeito da vazão dos reagentes

O efeito da vazão dos reagentes (agente redutor e carreador) na eficiência da geração do hidreto foi avaliado considerando-se um intervalo de 2 a 6 mL min⁻¹. Conforme apresentado na Figura 7, o aumento da vazão dos reagentes até 4 mL min⁻¹ levou a uma melhor sensibilidade na determinação do hidreto e, em vazões superiores a esta, uma diminuição do sinal analítico foi observado. Esse comportamento está

relacionado à efervescência excessiva no separador gás-líquido quando utilizada vazões dos reagentes superiores a 4 mL min^{-1} , o que facilita a transferência de água para a cela de atomização, diminuindo a sensibilidade e a precisão. Sendo assim, foi estabelecida uma vazão de 4 mL min^{-1} para promover a mistura entre o NaBH_4 (agente redutor) e o HCl (carreador) misturado com a amostra.

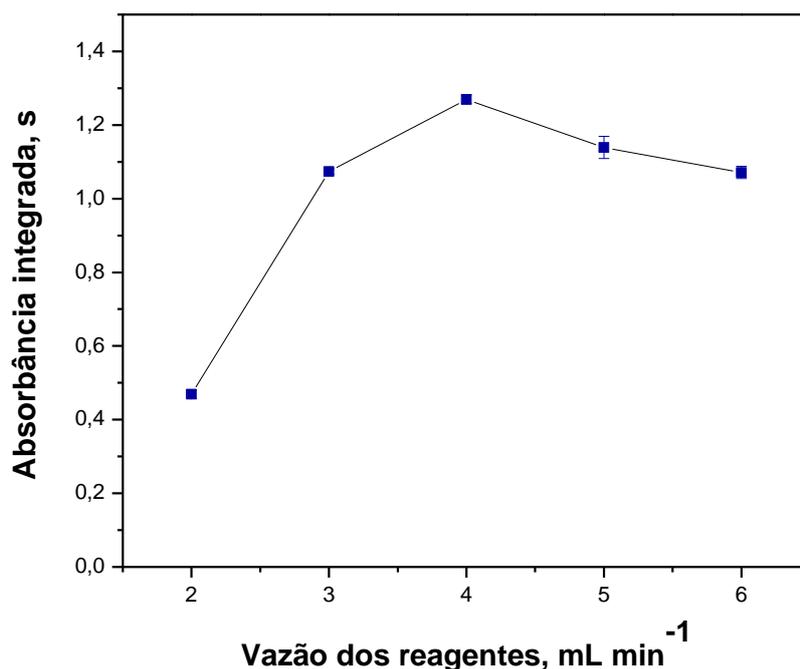


Figura 7. Efeito da vazão do NaBH_4 e HCl na absorbância integrada do As(III) na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições: NaBH_4 0,5% (m/v) e HCl 1 mol L^{-1} . Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

5.2 INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DO HCl E NaBH₄ NA ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE As INORGÂNICO

As concentrações de HCl e NaBH₄ são parâmetros que também devem ser avaliados, uma vez que influenciam diretamente na geração dos diferentes hidretos de As e, conseqüentemente, na sensibilidade, precisão e exatidão. Visando a geração seletiva dos hidretos das espécies inorgânicas de As (As(III) e As(V)), o efeito da concentração do agente redutor (NaBH₄) na geração dos hidretos das espécies As(III), As(V), MMA e DMA foi avaliado. Esse estudo foi realizado uma vez que a concentração do NaBH₄ influencia diretamente na proporção dos hidretos provenientes do DMA e As inorgânico em presença de alta concentração de HCl. Para o propósito, foram preparadas soluções contendo 10 µg L⁻¹ dos analitos e soluções do redutor com diferentes concentrações, de 0,1 a 1,5% (m/v). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.

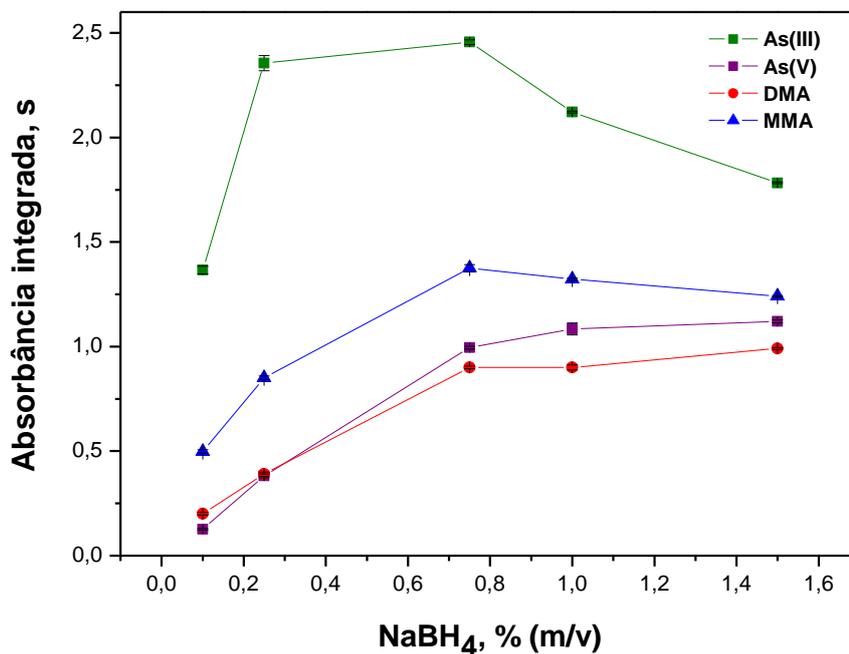
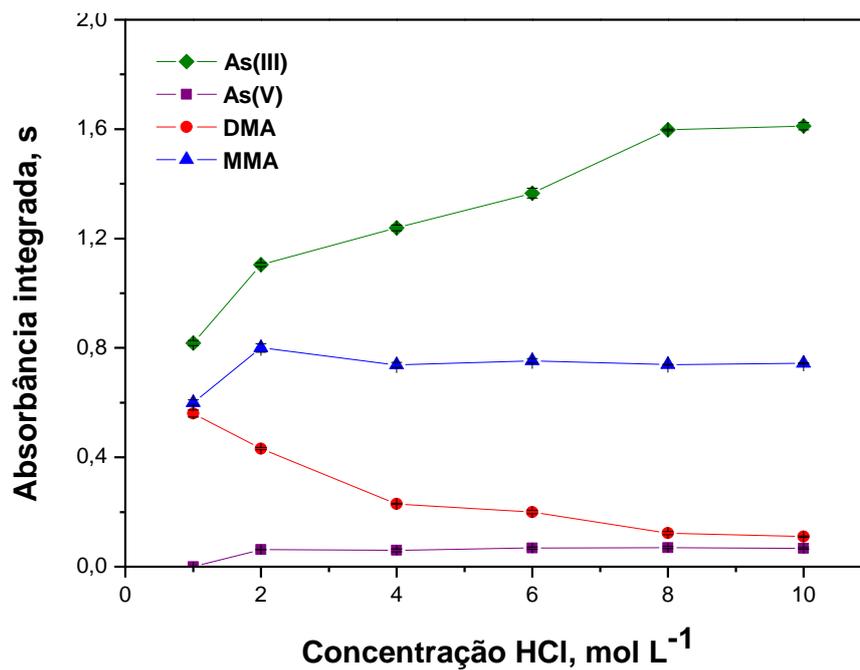


Figura 8. Influência da concentração do NaBH₄ nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para 10 µg L⁻¹ de cada espécie. Como carreador da amostra foi utilizado HCl 6 mol L⁻¹. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

Segundo trabalhos já publicados, com uma concentração moderada de HCl (4 a 6 mol L⁻¹) e NaBH₄ 2% (m/v), é possível determinar seletivamente as espécies inorgânicas de As.^{56,63,82} No presente estudo, conforme mostra a Figura 8, fixando-se a concentração de HCl em 6 mol L⁻¹, para toda a faixa de concentração de NaBH₄ avaliada, houve contribuição significativa de todas as espécies de As na geração dos hidretos, não sendo possível separar as espécies de As nessas condições. A concentração máxima de NaBH₄ foi limitada em 1,5% (m/v) devido à excessiva produção de hidrogênio, aumentando a instabilidade do sistema e prejudicando a precisão das medidas.

Frente aos resultados obtidos, decidiu-se avaliar os efeitos da concentração de HCl na geração dos hidretos das espécies de As, sendo selecionado intervalo de concentração de 1 a 10 mol L⁻¹. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9.

a)



b)

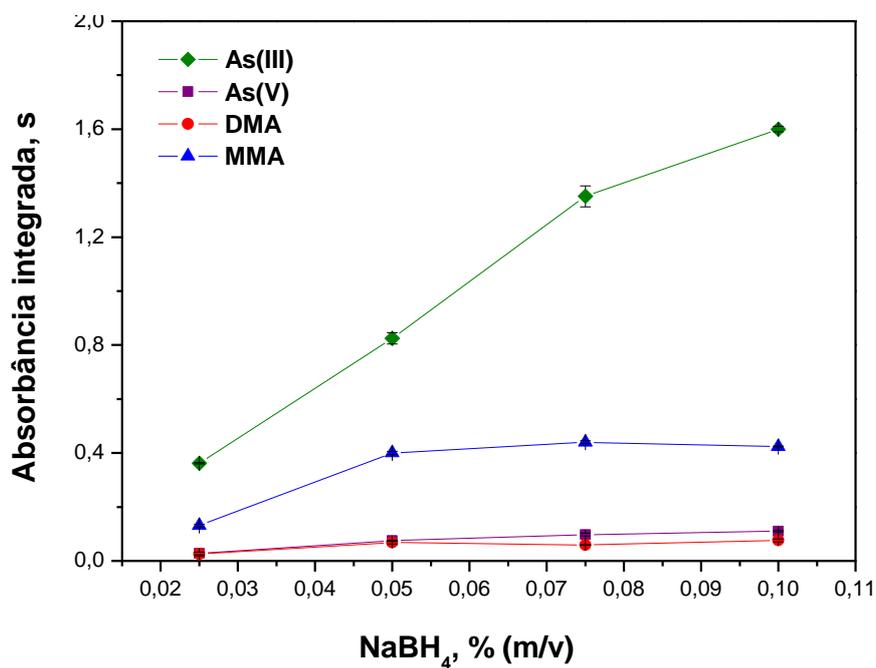


Figura 9. Influência das concentrações de HCl (a) e de NaBH₄ nas absorbâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para 10 µg L⁻¹ de cada espécie. Condições: (a) NaBH₄ 0,1 % (m/v); (b) HCl 10 mol L⁻¹. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

De acordo com a Figura 9(a), o aumento da concentração do ácido levou a uma melhora significativa na absorbância do As(III). Para as espécies As(V) e MMA não foram observados efeitos significativos em toda a faixa de concentração avaliada. Para a espécie DMA, uma diminuição gradativa do sinal analítico foi observada. Com o aumento da concentração do HCl para 10 mol L^{-1} , as absorbâncias obtidas para os hidretos das espécies As(V) e DMA foram equivalentes àquela do branco. Comportamento similar foi observado para os hidretos das diferentes espécies avaliadas frente à variação da concentração do redutor, conforme mostra a Figura 9(b).

Conforme a Figura 9(b), em meio com alta concentração de HCl (10 mol L^{-1}) e baixa concentração de NaBH_4 (0,1% (m/v)) somente o As(III) e MMA são detectados, pois se observa que o sinal analítico obtido para as espécies As(V) e DMA são negligenciáveis. Estes resultados estão de acordo com trabalhos já publicados. Foi relatado por Shraim *et al.*⁸² que a geração de hidreto a partir do DMA em solução é irrelevante na presença de NaBH_4 até 2% (m/v) e HCl 6 mol L^{-1} . De acordo com Pétursdóttir *et al.*⁵⁶, em presença de HCl 5 mol L^{-1} e NaBH_4 2% (m/v) a contribuição de DMA como dimetilarsina é de apenas 2-4%, enquanto que a eficiência para geração da metilarsina a partir do MMA é cerca de 40%.

Segundo Musil *et al.*⁶³, a menor eficiência da geração dos hidretos das espécies metiladas está associada à protonação das mesmas em meio fortemente ácido.⁶³ Em condições levemente ácidas até pH neutro, a redução do As(V) a As(III) para a geração da arsina não é termodinamicamente e cineticamente favorável, uma vez que o potencial de redução é inibido com o aumento do pH.⁹¹ No presente estudo, mesmo em meio fortemente ácido, o que poderia facilitar a redução do As(V), a concentração do NaBH_4 não foi suficiente para reduzir o As(V) a As(III), indicando que em baixa concentração de NaBH_4 e alta concentração de HCl a geração da arsina a partir do As(V) é cineticamente inviável. Com isso, fixando-se a concentração do HCl em 10 mol L^{-1} e a do NaBH_4 em 0,1% (m/v), é possível determinar seletivamente o As(III) presente no arroz, considerando-se a ausência do MMA. Ainda, conforme já relatado em outros trabalhos, o MMA não é comumente detectado no arroz.^{56,57}

5.3 CONDIÇÕES DE REDUÇÃO PARA A ESPECIAÇÃO DE As INORGÂNICO

As condições de acidez e concentração do agente redutor requeridas para a geração dos hidretos a partir das espécies As(III) e As(V) não são as mesmas e, conseqüentemente, os respectivos hidretos são gerados com diferente eficiência. Desse modo, para a determinação do As inorgânico, é necessário que o As(V) seja previamente reduzido a As(III) antes da sua determinação. Visando-se a determinação do As inorgânico nas mesmas condições do As(III), dois agentes pré-redutores foram testados: solução de L-cisteína 2% (m/v) e solução contendo KI/ácido ascórbico.

Quando utilizada a L-cisteína como pré-redutor, após cinco leituras consecutivas, observou-se queda significativa da absorbância do As, chegando o sinal ao nível do branco (Figura 10). Diante disso, analisou-se uma solução contendo As(III) na ausência do pré-redutor, mas nenhum sinal analítico foi detectado. Depois de várias tentativas, uma lavagem da cela de quartzo foi realizada para ativá-la novamente, uma vez que o processo de atomização do hidreto é criticamente influenciado pela superfície do quartzo. Após a lavagem da cela de quartzo, mediu-se a absorbância do As(III) na ausência do pré-redutor, sendo observado o retorno do sinal analítico. Contudo, após a estabilização do sinal de absorbância do As(III) na ausência da L-cisteína 2% (m/v), ao medir a absorbância do As(III) em solução contendo a L-cisteína 2% (m/v), o problema foi novamente detectado. Com isso, constatou-se a impossibilidade de se utilizar a L-cisteína como agente pré-redutor.

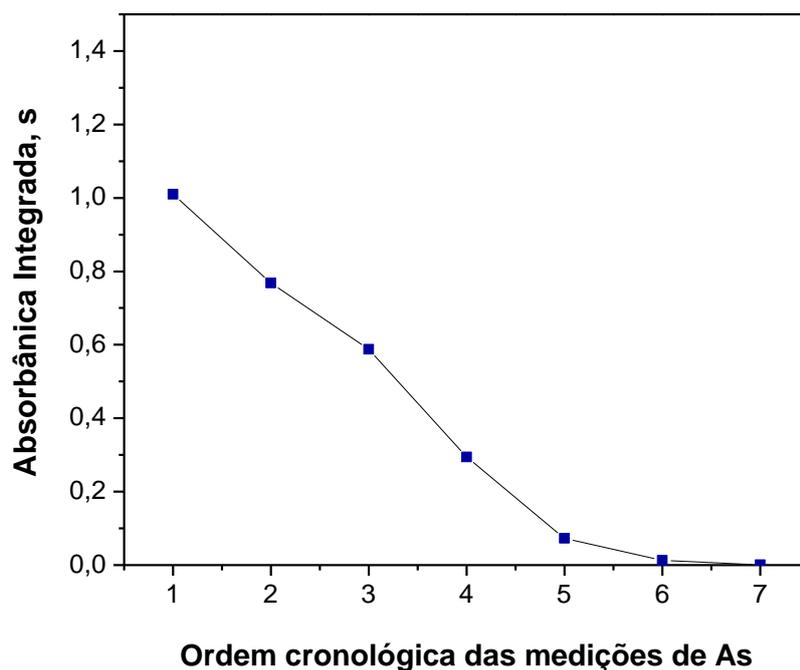


Figura 10. Efeito do pré-redutor L-cisteína na absorbância do As(V) após 7 leituras consecutivas da absorbância do As em solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(V). Condições: NaBH_4 0,1% (m/v) e HCl 10 mol L^{-1} .

A L-cisteína é recomendada para a pré-redução do As(V) a As(III)^{31,79,82,91}, em desacordo com o que se observou no presente trabalho. Possivelmente, o problema encontrado esteja relacionado com a formação de um composto volátil oriundo da L-cisteína. Esta possui grupo tiol em sua estrutura e, uma vez que o S e o O são similares, alguma mudança na superfície do quartzo pode ocorrer e com isso inviabilizar a utilização da L-cisteína. Recentemente, Svoboda *et al.*⁹² publicaram um trabalho onde, pela primeira vez, é relatado problema associado ao uso da L-cisteína como pré-redutor. No estudo, os autores observaram sinais não específicos de produtos da decomposição da L-cisteína, os quais foram retidos em um cartucho contendo NaOH (com diâmetro de 2 a 3 mm). Todavia, os autores não forneceram maiores informações sobre os produtos da decomposição da L-cisteína.

Diante da inviabilidade de se usar a L-cisteína, optou-se por uma mistura contendo KI e ácido ascórbico, também amplamente utilizada como pré-redutor do As(V).^{31,93} Foram avaliadas três concentrações da mistura frente à eficiência na

geração de hidreto a partir do As(V). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 11.

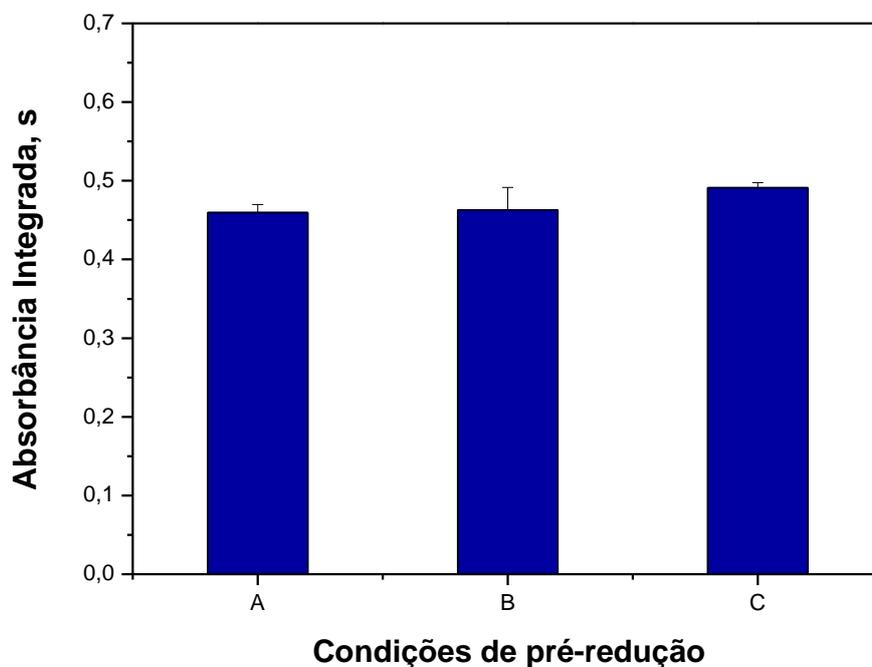


Figura 11. Influência do pré-redutor KI/ácido ascórbico na absorbância integrada do As(V), para $3 \mu\text{g L}^{-1}$ da espécie. Condições: (A) KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v); (B) KI 0,5% (m/v) e ácido ascórbico 0,5% (m/v); (C) KI 1% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v). As soluções de KI/ácido ascórbico foram preparadas em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de 10 determinações.

Devido a melhor sensibilidade e precisão, foi escolhida a solução contendo 5% (m/v) de KI e 1% (m/v) de ácido ascórbico. Salienta-se que a pré-redução é eficiente se a mistura é preparada em meio contendo HCl. Para que a diluição da solução da amostra fosse a menor possível e assim preservar a sensibilidade, a concentração de HCl na mistura foi $1,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Após a escolha da condição de pré-redução do As(V), testes foram realizados para avaliar a influência do pré-redutor na geração dos hidretos provenientes das

espécies inorgânicas e orgânicas de As. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 12.

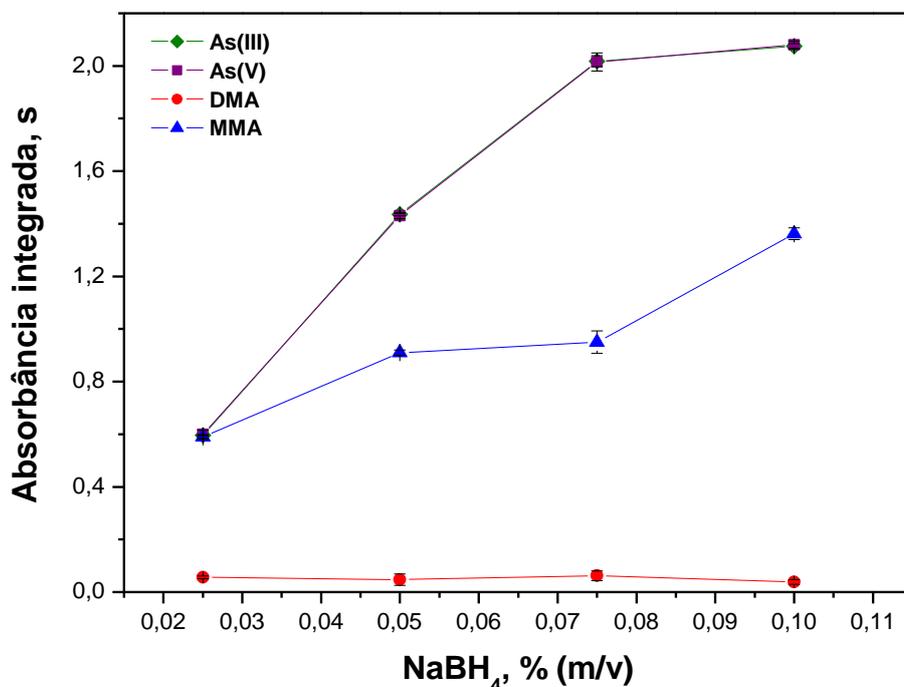


Figura 12. Influência da concentração de NaBH₄ nas absorvâncias do As(III), As(V), DMA e MMA, para 10 µg L⁻¹ de cada espécie. As absorvâncias correspondem às espécies submetidas ao tratamento de pré-redução com KI (5% mv) e ácido ascórbico (1% m/v), em HCl 1,2 mol L⁻¹. Como carreador da solução da amostra foi utilizado HCl 10 mol L⁻¹.

Conforme observado na Figura 12, a mistura KI/ácido ascórbico reduz o As(V) a As(III), garantindo a determinação das duas espécies, visto que o As(V) pode ser determinado por diferença. Além disso, ambas as espécies As(V) e As(III) podem ser determinadas sob as mesmas condições utilizadas para o As(III) (HCl 10 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1% (m/v)). Além disso, o As inorgânico pode ser determinado sem a contribuição do DMA, pois este não é detectado nas condições utilizadas para a geração de hidreto a partir do As(III). Desse modo, é possível a análise de especiação química do As inorgânico, As(III) e As(V) em arroz.

Na Tabela VI são resumidas as condições estabelecidas no presente trabalho para a determinação de As(III), As inorgânico e As total.

Tabela VI. Resumo das condições estabelecidas para a especificação química de As(III), As inorgânico e determinação de As total por HG-AAS.

Variável	As(III) e As inorgânico	As Total
HCl, mol L ⁻¹	10	6
NaBH ₄ , % (m/v)	0,1	0,75
Vazão do HCl e NaBH ₄ , mL min ⁻¹	4	4
Volume de solução da amostra, µL	250	250
Vazão do gás de arraste, mL min ⁻¹	50	50
KI/Ácido ascórbico, % (m/v) ^a	5/1-	

^a solução pré-redutora utilizada somente para a determinação de As inorgânico.

5.4 AVALIAÇÃO DA INTERCONVERSÃO ENTRE As(III) E As(V)

Devido à possibilidade de interconversão entre as espécies inorgânicas pentavalentes e trivalentes de As durante o procedimento de extração das mesmas no arroz, a estabilidade do As(V) e do As(III) foi investigada. Para o propósito, foram preparadas soluções de As(V) e As(III) em HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e submetidas ao processo de extração em forno micro-ondas, como descrito no item 4.3.2. Conforme observado na Tabela VII, a recuperação do As(III) e As(V) foi próxima a 100%, demonstrando a estabilidade das espécies no meio extrator e à radiação micro-ondas nas condições usadas.

Tabela VII. Recuperação das espécies inorgânicas de As em HNO₃ 0,14 mol L⁻¹, submetidas à radiação micro-ondas. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

Espécie	Adicionado, µg L ⁻¹	Encontrado, µg L ⁻¹	Recuperação, %
As(III)	50	51,5 ± 2,5	103
As(III) + As(V)	50	93,1 ± 1,3	93

Posteriormente, a uma amostra de arroz integral foram adicionadas alíquotas de solução de As(III), As(V) e DMA, a qual foi em seguida submetida ao procedimento de extração e as espécies de As determinadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela VIII.

Tabela VIII. Recuperação das espécies de As adicionadas a uma amostra de arroz integral antes da etapa de extração. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

Espécie	Adicionado, ng g ⁻¹	Encontrado, ng g ⁻¹	Recuperação, %
As(III)	0	40,4 ± 2,7	-
	42 ^a	83,9 ± 1,6	102
As(V)	0	88,6 ± 3,2	-
	42 ^a	125 ± 9	96
DMA	0	nd	-
	42 ^a	nd	nd

^a: foi adicionada alíquota de solução de modo a obter-se esta concentração na amostra sólida;
nd: não detectado

Como observado na Tabela VIII, as recuperações do As(III) e As(V) foram próximas a 100%. Portanto, as espécies de As mantiveram-se estáveis durante o procedimento de extração ou a interconversão entre elas foi muito baixa. Os resultados obtidos também demonstram que a geração do hidreto proveniente do DMA não é detectável nas condições utilizadas, permitindo a determinação do As(III) e As inorgânico no arroz, considerando-se a ausência de MMA.

O estudo sobre a possível interconversão entre as espécies durante o procedimento de extração é necessário, principalmente quando o objetivo é diferenciar as espécies inorgânicas. Segundo Narukawa *et al.*⁹, a presença de I⁻ na amostra pode, durante o procedimento de extração, reduzir parte do As(V) a As(III). Sendo assim, os autores sugerem a adição de Ag durante a extração, para evitar a redução do As(V). Por outro lado, a concentração de DMA não é alterada, mantendo-se constante em toda a faixa de concentração avaliada. Huang *et al.*² sugerem que o melhor meio de extração das espécies de As, garantindo a integridade delas, é HNO₃ 0,28 mol L⁻¹.

Segundo esses autores, o uso de HNO_3 em concentrações inferiores a $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ e aquecimento leva à significativa redução do As(V) a As(III), em cerca de 20%. No presente trabalho, a extração das espécies de As foi também avaliada para HNO_3 $0,28 \text{ mol L}^{-1}$. Contudo, não foi observada a redução do As(V) a As(III) durante o processo de extração das espécies. Na Tabela IX são apresentados os resultados obtidos quando utilizado o HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ ou $0,28 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela IX. Concentrações de As(III) e As inorgânico encontradas no arroz em função dos meios extratores. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações ($n = 3$). As concentrações das espécies são em ng g^{-1} .

Amostra de Arroz	Solução Extratora			
	HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$		HNO_3 $0,28 \text{ mol L}^{-1}$	
	As(III)	As Inorgânico	As(III)	As Inorgânico
Cateto	116 ± 3	163 ± 2	112 ± 2	162 ± 1
Integral				

Quando realizada a análise estatística dos dados obtidos, citados na Tabela IX, segundo o teste- t para dois conjuntos de dados pareados, ambos os métodos de extração podem ser aplicados, uma vez que não foi observada diferença significativa em um nível de confiança de 95% (t calculado: 1,94 ; t crítico 4,30). Esses resultados indicam que a solução HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ pode ser usada para a extração das espécies inorgânicas de As em arroz.

Outros dois métodos de extração, um utilizando HClO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e o outro HNO_3 1% (v/v) + H_2O_2 1% (v/v), foram testados para a extração das espécies de As em uma amostra de arroz, seguindo-se os procedimentos descritos no item 4.3.2. Os resultados foram comparados com os obtidos quando utilizado HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, conforme a Tabela X.

Tabela X. Concentrações de As(III) e As inorgânico encontradas em arroz integral, em função dos meios extratores. Os resultados obtidos são a média e o desvio padrão de 3 determinações (n = 3). As concentrações das espécies são em ng g⁻¹.

	Solução Extratora		
	HNO ₃ 0,14 mol L ⁻¹	HClO ₄ 0,05 mol L ⁻¹	HNO ₃ 1% (v/v) + H ₂ O ₂ 1% (v/v)
As(III)	50,6 ± 1,2	48,4 ± 6,3	-
As inorgânico	88,2 ± 4,9	86,1 ± 7,9	86,1 ± 7,9

Quando realizada a análise estatística dos dados citados na Tabela X, segundo o teste-*t* para dois conjuntos de dados pareados, ambas as soluções extratoras HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HClO₄ 0,05 mol L⁻¹ podem ser usadas, uma vez que não se observa diferença significativa em um nível de confiança de 95% (*t* calculado: 1,47 ; *t* crítico 4,30). Ainda, quando aplicado o teste ANOVA (*Analysis of Variance*), para as três soluções extratoras, verifica-se que, com um nível de confiança de 95%, os resultados obtidos para As inorgânico não tem diferença significativa (*p* = 0,634, *α* crítico = 0,05).⁹⁴

Segundo Narukawa *et al.*⁹, a eficiência da extração com HNO₃ 0,28 mol L⁻¹ é dependente do tipo de arroz. Mas, de acordo com os resultados mostrados nas Tabelas IX e X, não foi observada diferença para o arroz analisado. Ou seja, a eficiência de extração do As(III) e As inorgânico foi a mesma para as diferentes soluções extratoras. Os resultados indicam que a solução HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ pode ser usada para a extração das espécies inorgânicas de As no arroz, garantindo a integridade das mesmas nas condições do método utilizado.

5.5 SENSIBILIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO

5.5.1 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito do método desenvolvido para análise de especiação química de As em arroz são resumidos na Tabela XI. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados considerando-se os critérios de três e dez vezes o desvio padrão, (3s) e (10s), respectivamente, de dez determinações consecutivas das

espécies no branco analítico. Os limites de detecção em ng g^{-1} foram calculados considerando-se 500 mg de amostra em um volume final de 14 mL de suspensão.

No caso da determinação da concentração de As total, considerou-se 250 mg de amostra em 10 mL de suspensão. O LD do As total foi mais alto (14 ng g^{-1}) do que os LDs do As(III) e As inorgânico devido ao meio oxidante ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2 % (m/v) e HNO_3 10%(v/v)) em que o As se encontrava, tendo-se em vista a mistura utilizada para a extração. Este meio oxidante desfavoreceu a geração dos hidretos, cuja reação é favorecida em meio redutor.

Tabela XI. Parâmetros de mérito do método desenvolvido para especificação química de As inorgânico mediante HG-AAS.

Parâmetro	As(III)	As Inorgânico ^a
LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	0,07	0,14
LD, ng g^{-1}	1,96	3,85
LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	0,2	0,4
LQ, ng g^{-1}	5,6	11,2
Equação de regressão linear	$y = 0,065x + 0,006$	$y = 0,074x - 0,023$
Coefficiente de correlação linear, r	0,9997	0,9996

^a: pré-redução com KI 5% (m/v)/ácido ascórbico 1% (m/v) em HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$

O método desenvolvido mostrou-se adequado para a especificação química de As inorgânico em arroz, cujo LD é da mesma ordem de grandeza daqueles relatados para HG-AFS (1 ng g^{-1}) e HG-ICP-MS ($1,1 \text{ ng g}^{-1}$).^{10,63} Vale destacar que a sensibilidade da HG-AFS e HG-ICP-MS é superior a da HG-AAS. O baixo LD do presente método pode ser atribuído à utilização da lâmpada EDL como fonte de radiação, pouca diluição da amostra e ao apreciável volume da mesma (250 μL). O separador gás-líquido também desempenhou um papel importante, pois uma maior quantidade de amostra pôde ser processada sem a formação excessiva de espuma, o que resultaria na transferência de água para a cela de atomização e no aumento do ruído como consequência.

5.5.2 Avaliação da exatidão do método

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, foram analisados os materiais certificados de farinha de arroz, do “*National Institute of Standards and Technology*” (NIST) 1568a e do “*European Reference Materials*” (ERM) BC211. Como pode ser observado na Tabela XII, os valores obtidos para As total estão de acordo com os certificados, não sendo observada diferença significativa quando aplicado o teste-*t* a um nível de confiança de 95%. A concentração média encontrada para o As inorgânico no ERM BC211 foi menor que a certificada. Porém, considerando-se o desvio padrão e o respectivo intervalo de confiança, não há diferença significativa entre o valor certificado e o valor encontrado a um nível de confiança de 95%.⁹⁴

Tabela XII. Análise dos materiais de referência certificados submetidos à extração com HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e determinação de As por HG-AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão de três determinações (n=3).

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

5.6 DETERMINAÇÃO DE As TOTAL NAS AMOSTRAS DE ARROZ

Para a extração do As total, visando a sua determinação mediante HG-AAS, a mistura K₂S₂O₈ 2% (m/v) + HNO₃ 10% (v/v) foi utilizada, devido à ausência do sinal analítico do As quando a solução de arroz decomposto com ácido em forno micro-ondas foi analisada. A principal razão deste comportamento pode ser o efeito causado pelos óxidos de nitrogênio presentes na solução da amostra.^{95,96} Em um estudo realizado por Flores *et al.*⁹⁵ foi observado que o íon NO₂⁻ foi responsável pela baixa recuperação do As. Esse mesmo comportamento também foi observado em outro estudo, onde a presença do íon NO₂⁻ foi responsável pela redução dos sinais do Se e do Hg, determinados por HG-AAS e CV-AAS, respectivamente.⁹⁷ A supressão do sinal analítico observada pode estar relacionada com a competição do íon NO₂⁻ e o hidreto

gerado pelo agente redutor, ou ainda pelo elevado sinal de fundo (que não é corretamente corrigido) devido à absorção da radiação da fonte pelo $\text{NO}_{2(g)}$ presente no atomizador (espécies voláteis geradas pelo íon NO_2^- que podem ser transportados até o atomizador juntamente com o hidreto gerado).^{95,97}

Dadas as circunstâncias, a extração alcalina foi empregada no sentido de simplificar o trabalho e também garantir a exatidão dos resultados. Ainda, no sentido de avaliar o método de extração utilizado, quatro amostras foram selecionadas e submetidas à digestão ácida em forno micro-ondas e o As total determinado por ICP-MS. Na Tabela XIII são apresentados os resultados obtidos na determinação de As total nas amostras de arroz.

Tabela XIII. Concentração de As total encontrada nas amostras de arroz. Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações (n = 3).

Amostra	Concentração, ng g ⁻¹		t calculado
	HG-AAS ^a	ICP-MS ^b	
Agulha/Integral	133 ± 9	-	-
Agulha/Orgânico parboilizado	116 ± 2	-	-
Agulha/Orgânico polido	223 ± 9	229 ± 18	1,73
Agulha/Parboilizado	168 ± 5	-	-
Agulha/Polido	83 ± 9	-	-
Agulhinha/Polido	163 ± 3	153 ± 18	1,17
Arbóreo/Polido	150 ± 7	-	-
Cateto/Biodinâmico, orgânico e integral	241 ± 9	-	-
Cateto/Integral	258 ± 10	-	-
Cateto/Orgânico integral	203 ± 5	207 ± 11	1,69
Cateto/Orgânico polido	133 ± 6	121 ± 8	4,24
Cateto/Polido	136 ± 6	-	-
Vermelho/Integral	222 ± 1	-	-

^a: determinado por HG-AAS, sendo a amostra submetida à extração alcalina

^b: determinado por ICP-MS, sendo a amostra submetida à digestão ácida.

Na Tabela XIII observa-se que a concentração de As total variou de 83 a 258 ng g⁻¹, com uma concentração média de 156 ng g⁻¹. Conforme é possível observar, quando comparados os diferentes tipos de beneficiamento do arroz (integral, polido ou parboilizado), maiores concentrações de As estão relacionadas ao arroz integral, seguido do arroz parboilizado e arroz polido. De acordo com a análise estatística, segundo o teste-*t*, para dois conjuntos de dados pareados, em um nível de confiança de 95%, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos, indicando a exatidão dos resultados obtidos mediante extração do As com a mistura K₂S₂O₈/HNO₃.

Os resultados obtidos para As total são similares com os relatados em trabalhos publicados a respeito do assunto, onde é citado que há maior tendência de acúmulo de As no farelo do arroz.^{4,52,53} Em estudo realizado por Batista *et al.*⁴, envolvendo amostras de arroz oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, maiores teores de As foram encontradas no arroz integral (concentração média de 349 ± 11 ng g⁻¹), seguido do arroz parboilizado (concentração média de 262 ± 33ng g⁻¹) e arroz polido (concentração média de 214 ± 81,3 ng g⁻¹). O arroz parboilizado é obtido através do processo hidrotérmico, onde ainda com a casca o grão é submetido a um cozimento parcial, podendo esse processo levar a uma maior absorção do As pelo grão. Contudo, apesar de o arroz orgânico ser obtido através de uma cultura livre de insumos químicos, em uma amostra a concentração de As era alta (arroz integral/orgânico/biodinâmico), indicando que a presença de As no arroz não está relacionada somente ao uso de praguicidas e fertilizantes químicos, mas também com a característica do solo.

5.7 DETERMINAÇÃO DE As INORGÂNICO NO ARROZ

O método desenvolvido para a especiação química de As inorgânico, utilizando HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ para extrair as espécies de As, foi aplicado na análise das amostras de arroz. As concentrações de As inorgânico, As(III) e As(V) encontradas são apresentadas na Tabela XIV.

Tabela XIV. Concentração das espécies de As encontradas no arroz mediante HG-AAS. A concentração de As(V) foi obtida por diferença (As inorgânico - As(III)). Os resultados mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações.

Amostra	Concentração, ng g ⁻¹		
	As inorgânico	As(III)	As(V) ^a
Agulha/Integral	88 ± 5	51 ± 1	37 ± 5
Agulha/Orgânico parboilizado	102 ± 7	70 ± 1	32 ± 7
Agulha/Orgânico polido	143 ± 5	105 ± 1	39 ± 5
Agulha/Parboilizado	150 ± 4	75 ± 4	76 ± 5
Agulha/Polido	54 ± 4	30 ± 8	24 ± 8
Agulhinha/Polido	68 ± 2	62 ± 2	5 ± 3
Arbóreo/Polido	125 ± 1	97 ± 4	28 ± 4
Cateto/Biodinâmico, orgânico e integral	145 ± 4	113 ± 15	32 ± 15
Cateto/Integral	163 ± 2	116 ± 3	46 ± 4
Cateto/Orgânico integral	128 ± 6	98 ± 5	30 ± 8
Cateto/Orgânico polido	56 ± 3	47 ± 3	8 ± 5
Cateto/Polido	87 ± 1	58 ± 1	29 ± 1
Vermelho/Integral	169 ± 5	158 ± 2	11 ± 6

^a estimado por diferença.

Conforme observado, a concentração de As inorgânico nas amostras de arroz analisadas variou de 54 a 169 ng g⁻¹, cuja concentração média foi 114 ng g⁻¹. Quando os resultados obtidos são comparados ao limite máximo tolerável para As inorgânico no arroz, 200 ng g⁻¹, estabelecido pela FDA/WHO, em todas as amostras analisadas a concentração de As encontrada foi inferior ao limite.⁶⁰ No Brasil, a legislação vigente estabelece somente limite máximo para As total no arroz, que é 300 ng g⁻¹. Portanto, todas as amostras analisadas estão em concordância com o limite estabelecido.⁹⁸

O As inorgânico nas amostras analisadas representa cerca de 70% da concentração total de As no arroz. Quando comparadas as concentrações de As(III) e As(V), o As(III) é a espécie predominante. A Figura 13 ilustra a correlação entre as concentrações das espécies de As inorgânico, As total, As (III) e As (V) encontradas nas amostras de arroz analisadas.

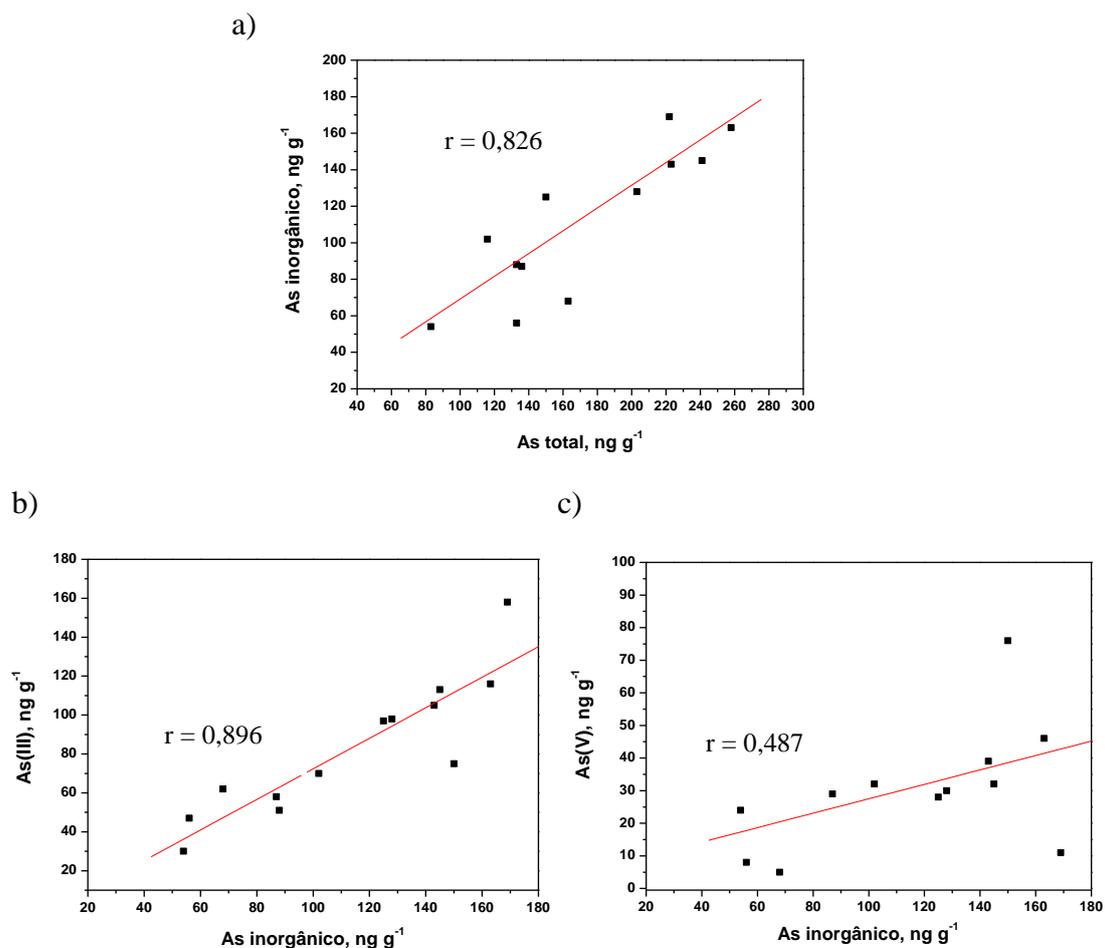


Figura 13. Correlação entre as concentrações de (a) As inorgânico e As total, (b) As(V) e As inorgânico e (c) As(III) e As inorgânico nas amostras de arroz analisadas.

Conforme observado na Figura 13, boa correlação (r) foi obtida quando comparadas as concentrações de As inorgânico com As total e As(III) com As inorgânico; as correlações obtidas foram 0,826 ($p = 0,0005$) e 0,896 ($p < 0,001$), respectivamente. Isso indica que o aumento do teor de As total nas amostras de arroz analisadas está relacionado ao aumento da concentração de As inorgânico, principalmente na sua forma mais tóxica, o As(III). Por outro lado, uma fraca correlação ($r = 0,487$; $p = 0,0916$) foi obtida quando comparadas as concentrações de As(V) e As inorgânico.

Os resultados obtidos no presente trabalho são condizentes com os relatados em trabalhos anteriores. O As(III) foi a espécie predominante, cuja concentração foi maior do que a do As(V), representando 70% do As inorgânico, em um estudo

realizado com amostras provenientes do Japão.⁶⁷ Segundo outro estudo, o As inorgânico representou cerca de 70% do As em amostras de arroz de Bangladesh e de produtos à base de arroz.^{5,49} Em outro trabalho publicado, foi citado que a concentração de As inorgânico foi 38 a 58% e 26 a 84% do As total determinado em amostras de arroz da Itália e do Reino Unido, respectivamente.^{3,56} Batista *et al.*⁴ também observaram a predominância da espécie As(III) no arroz brasileiro, no qual as espécies As(III) e As(V) representaram cerca de 40 e 18 % da concentração total de As, respectivamente.

A predominância do As inorgânico, principalmente na forma de As(III), pode ser explicada pela facilidade que a espécie tem em ser absorvida através dos transportadores de Si(OH)_4 , além de formar complexos estáveis com os grupos tióis presentes na planta. Além disso, na própria planta pode ocorrer redução enzimática do As(V) (absorvido através dos transportadores de HPO_4^{2-}) a As(III).⁴⁷ Esses processos auxiliam no transporte de As e aumentam a concentração de As inorgânico no grão de arroz.

Segundo Welna *et al.*⁶², é possível classificar o arroz em dois tipos: arroz tipo inorgânico, onde as espécies predominantes são o As(III) e As(V), e arroz tipo DMA, onde a espécie dimetilada de As é a predominante. Essas características estariam relacionadas ao sistema de plantio do arroz; o sistema de várzea facilitaria a absorção das espécies inorgânicas de As em condições anaeróbicas, enquanto que o plantio do tipo sequeiro, que é caracterizado por condições aeróbicas, facilitaria à absorção do DMA.^{46,99} Conseqüentemente, com base no sistema de plantio do arroz no Estado do Rio Grande do Sul (sistema de várzea) e nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que arroz do tipo inorgânico é produzido e comercializado no referido estado. Contudo, para classificar o arroz dentro dessa categoria, um número maior de amostras deve ser analisado, determinando-se também a concentração de DMA nas mesmas.

6. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método adequado para análise de especiação química de As inorgânico em arroz por HG-AAS. O método é simples, de baixo custo e de fácil utilização, podendo ser facilmente aplicável em laboratórios de rotina. As espécies de As inorgânico, As(III) e As(V), podem ser extraídas com HNO_3 0,14 mol L^{-1} sob radiação micro-ondas ou ainda com HNO_3 0,28 mol L^{-1} e aquecimento em banho-maria a 95°C, garantindo a integridade das referidas espécies.

A geração seletiva de hidretos de As(III) é possível através do uso de NaBH_4 0,1% (m/v) e HCl 10 mol L^{-1} . O As(V) presente nos extratos pode ser reduzido com KI e ácido ascórbico e determinado como As(III), sendo a concentração do As(V) obtida por diferença. Desse modo, a separação do As(III) e As(V) é eficiente, proporcionando resultados precisos e exatos.

A exatidão, avaliada através da análise de materiais de referência certificados, é boa, com recuperações próximas a 100%. Os limites de quantificação obtidos - 5,6 e 11,2 ng g^{-1} , para As(III) e As inorgânico, respectivamente - são adequados, possibilitando a quantificação de ambos no arroz. Salienta-se que o tipo de separador de gás-líquido utilizado previne a transferência de água para a cela de atomização, o que prejudicaria a sensibilidade e a precisão das medidas.

A determinação extração do As mediante com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2% (m/v) e HNO_3 10% (v/v), combinada com aquecimento em banho-maria, permite a determinação precisa e exata do As total no arroz por HG-AAS. A exatidão é assegurada pelo ajuste das soluções de calibração e amostras no que diz respeito às concentrações de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e HNO_3 .

A concentração de As nas amostras de arroz analisadas foi menor que os limites máximos permitidos pela FDA/WHO para As inorgânico e pela ANVISA para As total.

O método de especiação química de As inorgânico pode ser proposto a laboratórios oficiais, onde é realizada a determinação de As em arroz para fins de avaliação de risco e fixação de limites máximos de As inorgânico no cereal.

7. REFERÊNCIAS

1. Jain, C. K.; Ali, I. *Water Res.* **2000**, 34, 4304.
2. Huang, J.-H.; Ilgen, G.; Fecher, P. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 800.
3. Sommella, A.; Deacon, C.; Norton, G.; Pigna, M.; Violante, A.; Meharg, A. A. *Environ. Pollut.* **2013**, 181, 38.
4. Batista, B. L.; Souza, J. M. O.; De Souza, S. S.; Barbosa Jr, F. *J. Hazard. Mater.* **2011**, 191, 342.
5. Sun, G.-X.; Williams, P. N.; Zhu, Y.-G.; Deacon, C.; Carey, A.-M.; Raab, A.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. *Environ. Int.* **2009**, 35, 473.
6. Schoof, R. A.; Yost, L. J.; Eickhoff, J.; Crecelius, E. A.; Cragin, D. W.; Meacher, D. M.; Menzel, D. B. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, 37, 839.
7. Meharg, A. A.; Rahman, M. M. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 229.
8. Tyson, J. *ISRN Anal. Chem.* **2013**, 2013, 24.
9. Narukawa, T.; Suzuki, T.; Inagaki, K.; Hioki, A. *Talanta* **2014**, 130, 213.
10. Chen, B.; Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; Huang, J.-H. *Anal. Method.* **2014**, 6, 7554.
11. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rice Market Monitor 2015. < <http://www.fao.org/economic/est/publications> > Acessado em 14 de abril 2015.
12. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Domains. < <http://faostat3.fao.org/browse> > Acessado em 14 de abril de 2015.
13. IRGA. Instituto Rio Grandense do arroz. <<http://www.irga.rs.gov.br/upload> > Acessado em 10 de abril de 2014.
14. Walter, M.; Marchezan, E.; Avila, L. A. d. *Cienc. Rural* **2008**, 38, 1184.
15. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rice international commodity profile. < www.fao.org/fileadmin/templates > Acessado em 15 de abril de 2015.

16. Souza, J. M. O.; Carneiro, M. F. H.; Paulelli, A. C. C.; Grotto, D.; Magalhães Júnior, A. M.; Barbosa Júnior, F.; Batista, B. L. *Quím. Nova* **2015**, 38, 118.
17. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por grandes regiões, segundo os produtos, período 2008-2009. < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica> > Acessado em 15 de abril de 2015.
18. Mercado corretora de mercadorias. Arroz em casca: Informações técnicas. <<http://www.clicmercado.com.br/novo/produtos> > Acesso em 15 de abril de 2015.
19. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas>. Acesso em 15 de abril de 2015.
20. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção de cultura de arroz. < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> > Acessado em 15 de abril de 2015.
21. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 23 de março de 2009. <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta>> Acessado em 15 de abril de 2015.
22. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº2 de 06 de fevereiro de 2012. <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta> > Acessado em 15 de abril de 2015.
23. Ramos, T. J. F.; Goularte, J. L. L. Arroz biodinâmico: uma estratégia inovadora na busca de vantagens competitivas. In XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Belo Horizonte, MG, Brasil, **2011**.
24. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao> Acessado em 15 de abril de 2015.
25. Gontijo, B.; Bittencourt, F. *An. Bras.Dermatol.* **2005**, 80, 91.

26. Kumaresan M.; Riyazuddin, P. *Curr. Sci.* **2001**, 80, 837.
27. Przygoda, G.; Feldmann, J.; Cullen, W. R. *Appl. Organomet. Chem.* **2001**, 15, 457.
28. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. *Talanta* **2002**, 58, 201.
29. Fowler, B. A.; Selene, C. H.; Chou, J.; Jones, R. L.; Chen, C. J. In *Handbook on the Toxicology of Metals*; Third Edition, Academic Press: Burlington, 2007, p 367.
30. IARC. International Agency for Research on Cancer. Arsenic and arsenic compounds. < <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs>> Acessado em 20 de outubro de 2013.
31. Barra, C. M.; Santelli, R. E.; Abrão, J. J.; Guardia, M. D. L. *Quím. Nova* **2000**, 23, 58.
32. WHO. World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds. <<http://www.who.int/ipcs/publications>> Acessado em 15 de outubro de 2013.
33. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. < <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles>> Acessado em 15 de outubro de 2013.
34. Aureliano, M.; Nolasco, P. A.; Silva, J. J. R. F. d.; Silva, J. A. L. d. *Quím. Nova* **2012**, 35, 1062.
35. IARC. International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs. < <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>> Acessado em 13 de outubro de 2013.
36. Singh, A. P., Goel, R. K., Tajpreet, K. *Toxicol. Int.* **2011**, 18, 87.
37. Levy, J. L.; Stauber, J. L.; Adams, M. S.; Maher, W. A.; Kirby, J. K.; Jolley, D. F. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, 24, 2630.
38. Pawlik-Skowrońska, B.; Pirszel, J.; Kalinowska, R.; Skowroński, T. *Aquat. Toxicol.* **2004**, 70, 201.
39. Katsoyiannis, I. A.; Zouboulis, A. I. *Water Res.* **2004**, 38, 17.
40. Gong, Z.; Lu, X.; Cullen, W. R.; Chris Le, X. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, 16, 1409.

41. Loffredo, C. A.; Aposhian, H. V.; Cebrian, M. E.; Yamauchi, H.; Silbergeld, E. K. *Environ. Res.* **2003**, 92, 85.
42. Cui, J.; Shi, J.; Jiang, G.; Jing, C. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 5419.
43. Raber, G.; Stock, N.; Hanel, P.; Murko, M.; Navratilova, J.; Francesconi, K. A. *Food Chem.* **2012**, 134, 524.
44. Rubio, R.; Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; López-Sánchez, J.F.; Centrich, F. *Pure Appl. Chem.* **2012**, 84, 225.
45. Sun, G.-X.; Williams, P. N.; Carey, A.-M.; Zhu, Y.-G.; Deacon, C.; Raab, A.; Feldmann, J.; Islam, R. M.; Meharg, A. A. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 7542.
46. Xu, X. Y.; McGrath, S. P.; Meharg, A. A.; Zhao, F. J. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 5574.
47. Duan, G.; Liu, W.; Chen, X.; Hu, Y.; Zhu, Y. *Metallomics* **2013**, 5, 784.
48. Saha, G. C.; Ali, M. A. *Sci. Total Environ.* **2007**, 379, 180.
49. Williams, P. N.; Islam, M. R.; Adomako, E. E.; Raab, A.; Hossain, S. A.; Zhu, Y. G.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 4903.
50. Abedin, M. J.; Cotter-Howells, J.; Meharg, A. *Plant Soil* **2002**, 240, 311.
51. Talukder, A. S. M. H. M.; Meisner, C. A.; Sarkar, M. A. R.; Islam, M. S.; Sayre, K. D. *Rice Science* **2014**, 21, 99.
52. Rahman, M. A.; Hasegawa, H.; Rahman, M. M.; Rahman, M. A.; Miah, M. A. M. *Chemosphere* **2007**, 69, 942.
53. Rahman, M. A.; Hasegawa, H. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 4645.
54. Carey, A.-M.; Lombi, E.; Donner, E.; de Jonge, M.; Punshon, T.; Jackson, B.; Guerinot, M.; Price, A.; Meharg, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3275.
55. Huang, J. H.; Fecher, P.; Ilgen, G.; Hu, K. N.; Yang, J. *Food Chem.* **2012**, 130, 453.
56. Petursdottir, A. H.; Friedrich, N.; Musil, S.; Raab, A.; Gunnlaugsdottir, H.; Krupp, E. M.; Feldmann, J. *Anal. Method.* **2014**, 6, 5392.

57. FDA. Food and Drug Administration. Analytical results from inorganic arsenic in rice and rice products sampling. <<http://www.fda.gov/downloads/>> Acessado em 08 de maio de 2015.
58. Meharg, A. A. *Trends in Plant Sci.* **2004**, 9, 415.
59. Abedin, M. J.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. *Plant Physiol.* **2002**, 128, 1120.
60. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations<<http://www.fao.org/news/story/en/item/238802>> Acessado em 01 de maio de 2015.
61. Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Leeuwen, H.P.V., Lobinski, R. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1453.
62. Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P. *Trends Anal. Chem.* **2015**, 65, 122.
63. Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E.; Feldmann, J. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 993.
64. Reyes, M. N. M.; Cervera, M. L.; Campos, R. C.; Guardia, M. D. L. *Talanta* **2008**, 75, 811.
65. Kubachka, K. M.; Shockey, N. V.; Hanley, T. A.; Conklin, S. D.; Heitkemper, D. T. Elemental analysis manual: Arsenic speciation in rice and rice products using HPLC-ICP-MS determination. <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>> Acessado em 10 de maio de 2015.
66. Alava, P.; Van de Wiele, T.; Tack, F.; Du Laing, G. *Anal. Method.* **2012**, 4, 1237.
67. Narukawa, T.; Hioki, A.; Chiba, K. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 1122.
68. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D. *Analyst* **2004**, 129, 373.
69. Carlos González, J.; Lavilla, I.; Bendicho, C. *Talanta* **2003**, 59, 525.
70. Vieira, M. A.; Grinberg, P.; Bobeda, C. R. R.; Reyes, M. N. M.; Campos, R. C. *Spectrochim. Acta, Part B* **2009**, 64, 459.
71. Gonzalez, A.; Armenta, S.; Cervera, M. L.; Guardia, M. D. L. *Trend Anal. Chem.* **2010**, 29, 260.

72. Rasmussen, R.; Qian, Y.; Sloth, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 7851.
73. Chen, G.; Chen, T. *Talanta* **2014**, 119, 202.
74. Li, P.; Zhang, X.-q.; Chen, Y.-j.; Lian, H.-z.; Hu, X. *Anal. Method.* **2014**, 6, 4205.
75. Dedina, J.; Tsalev, D. L. *Hydride generation atomic absorption spectrometry*; Volume 130, Jonh Wiley & Sons, England, 1995.
76. D'Ulivo, A. *Spectrochim. Acta, Part B* **2010**, 65, 360.
77. D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 3008.
78. Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. d. *Quím. Nova* **2002**, 25, 1132.
79. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J. *Spectrochim. Acta, Part B* **2008**, 63, 396.
80. Hernandez-Zavala, A.; Matousek, T.; Drobná, Z.; Paul, D. S.; Walton, F.; Adair, B. M.; Dedina, J.; Thomas, D. J.; Styblo, M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 342.
81. Matousek, T.; Currier, J. M.; Trojankova, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; Gonzalez-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Styblo, M.; Dedina, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, 28, 1456.
82. Shraim, A.; Chiswell, B.; Olszowy, H. *Talanta* **1999**, 50, 1109.
83. Borba, R. P.; Coscione, A. R.; Figueiredo, B. R.; Zambello, F. *Quím. Nova* **2009**, 32, 970.
84. Berghof. Application Report Microwave Pressure Digestion of Food, Pharma and Cosmetics, 2011.
85. Calle, M. B.; Emteborg, H.; Linsinger, T. P. J.; Montoro, R.; Sloth, J. J.; Rubio, R.; Baxter, M. J.; Feldmann, J.; Vermaercke, P.; Raber, G. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 641.
86. Dědina, J. *Spectrochim. Acta, Part B* **2007**, 62, 846.
87. Dedina, J.; Matousek, T. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 301.

88. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A. *Spectrochim. Acta, Part B* **2002**, 57, 451.
89. Agterdenbos, J.; Van Noort, J. P. M.; Peters, F. F.; Bax, D. *Spectrochim. Acta Part B* **1986**, 41, 283.
90. Dědina, J. *Spectrochim. Acta Part B* **1992**, 47, 689.
91. Lehmann, E. L.; Fostier, A. H.; Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2013**, 104, 187.
92. Svoboda, M.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Dědina, J. *Spectrochim. Acta, Part B* **2015**, *In Press*.
93. Matos Reyes, M. N.; Cervera, M. L.; Campos, R. C.; Guardia, M. D. L. *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, 62, 1078.
94. James N Miller, J. C. M. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Chichester, Inglaterra, 2005.
95. Flores, É. M.M.; Silva, L. C. L. C.; Barin, J. S.; Saidelles, A. P. F.; Zanella, R.; Dressler, V. L.; Paniz, J. N. G. *Spectrochim. Acta Part B* **2001**, 56, 1883.
96. Brown, R. M.; Fry, R. C.; Moyers, J. L.; Northway, S. J.; Denton, M. B.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1560.
97. Nunes, D. L.; dos Santos, E. P.; Barin, J. S.; Mortari, S. R.; Dressler, V. L.; Flores, É. M.M. *Spectrochim. Acta Part B* **2005**, 60, 731.
98. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 101, de 27 de outubro de 2010 sobre contaminantes inorgânicos em alimentos. <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/>> Acessado em 10 de junho de 2015.
99. Arao, T.; Kawasaki, A.; Baba, K.; Matsumoto, S. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 1291.