

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de métodos de pré-concentração  
para a determinação de elementos traço e especiação  
de cromo e arsênio em amostras agrícolas**

**Ívero Pita de Sá\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador(a): Ana Rita de Araujo Nogueira**

**\* bolsista INCTAA-CAPES**

**São Carlos – SP**

**2021**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ívero Pita de Sá, realizada em 27/10/2021.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim (UESC)

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UESB)

Profa. Dra. Clarice Dias Britto do Amaral (UFPR)

Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos (UFC)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*A minha mãe, pelo amor incondicional*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e ter apresentado pessoas maravilhosas;

Aos meus pais, por todo amor, confiança, motivação e apoio nas etapas de minha vida;

Aos Familiares que mesmo com a distância torceram bastante por mim, avós, tios, primos, obrigado;

A todos os amigos da vida e aos que fiz em São Carlos gratidão por toda ajuda;

À Dra. Ana Rita, pela amizade, conselhos, confiança, suporte, orientação e por ser a nossa mãe em São Carlos;

Aos meus amigos da Embrapa Pecuária Sudeste, Aline, Bia, Carlos, Cibele, Ellen, July, Herick, Mayumi, Mykaelli e Raíza por toda convivência e experiências compartilhadas;

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Análise Instrumental Aplicada (GAIA);

À Julymar Higueira e Ana Beatriz pela paciência, amizade, suporte e parceria ao longo desses anos;

A todos os professores da graduação e pós-graduação que contribuíram com minha formação acadêmica;

A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste;

Ao programa de pós-graduação em química da Universidade Federal de São Carlos;

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos;

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas – INCTAA em parceria com a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudo de doutorado concedida.

Ao apoio financeiro do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), da Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (SAP-MAPA), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e pela parceria com Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ao projeto “BRS Aqua - Ações

estruturantes e inovação para fortalecimento das cadeias produtivas da Aquicultura no Brasil”.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, código de financiamento 001.

**Muito obrigado!!!**

## LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA - Análise de variância

As(III) – Arsênio trivalente

As(V) – Arsênio pentavalente

AsB – Arsenobetaína

CPE – Extração em ponto nuvem (Cloud Point Extraction)

CRM – Material de referência certificado (Certified Reference Material)

DMA – Ácido dimetilarsônico

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

FAO - Organização das Nações Unidas para a alimentação e agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

LC – Cromatografia líquida (Liquid Chromatography)

LC-ICP-MS - Cromatografia líquida associada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Liquid Chromatography Inductively Coupled Mass Spectrometry)

LOD – Limite de detecção (Limit of detection)

LOQ – Limite de quantificação (Limit of quantitation)

MIP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas  
(Microwave Inductively Plasma Optical Spectrometry)

MMA – Ácido monometilarsênico

$MQ_{ep}$  – Média quadrática do erro puro

$MQ_{faj}$  – Média quadrática da falta de ajuste

m/z – Razão massa/carga

RM – Resposta múltipla

SPE – Extração em fase sólida (Solid Phase Extractuin)

UV-VIS - Radiação eletromagnética da região do ultravioleta e visível

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos empregando a extração em ponto nuvem (CPE) para especiação química de As e Cr.....	09
Tabela 2. Espécies químicas de As comumente encontradas em pescados.....	14
Tabela 1.1. Estudos empregando SPE na extração de elementos traço em alimentos e amostras biológicas.....	21
Tabela 1.2. Parâmetros instrumentais empregados na determinação As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por MIP OES .....	23
Tabela 1.3. Parâmetros instrumentais empregados na determinação As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por ICP-MS.....	23
Tabela 1.4 Matriz do planejamento fatorial para otimização dos fatores envolvidos no procedimento de SPE-MIP OES determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn	29
Tabela 1.5 Determinações da fração de massa ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em fígado bovino (CRM 1577c), fígado de cação (DOLT-5) e fígado bovino (MR-Agro E3001a) pelo método proposto SPE-MIP OES (média $\pm$ desvio padrão, n = 3 e recuperação) ...	37
Tabela 1.6 Aplicação do procedimento SPE-MIP OES para fração de massa ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn em amostras de peixes e carnes e comparação com a determinação de ICP-MS (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	38
Tabela 2.1 Parâmetros instrumentais empregados na determinação de As e Cd por MIP OES .....	44
Tabela 2.2 Parâmetros instrumentais empregados na determinação de As e Cd por ICP-MS .....	45
Tabela 2.3 Fatores e níveis estudados no planejamento Box-Behnken.....	47
Tabela 2.4 Planejamento experimental Box-Behnken com os valores codificados e reais para otimização dos fatores envolvidos na coprecipitação de As, Cd e determinação por MIP OES .....	49
Tabela 2.5 ANOVA usando a RM com um nível de confiança de 95 % .....	50
Tabela 2.6 Resumo dos parâmetros analíticos desenvolvidos para o método de coprecipitação de As e Cd por MIP OES.....	53

Tabela 2.7 Avaliação da exatidão do método coprecipitação-MIP OES e ICP-MS nos CRMs (DOLT-5) e (TORT-3), resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão (n =3).....	54
Tabela 2.8 Aplicação do método separação e pré-concentração desenvolvido para determinação de As e Cd em amostras de peixes (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).55	55
Tabela 2.9 Comparação do método proposto com alguns estudos de coprecipitação em amostras de peixes.....	56
Tabela 3.1 Parâmetros instrumentais do LC-ICP-MS para análise de especiação química de As e Cr.....	622
Tabela 3.2 Avaliação da exatidão na determinação de As total em amostras de pescados por ICP-MS.....	67
Tabela 3.3 Matriz do planejamento Doehlert para otimização dos fatores envolvidos na extração das espécies de As em pescados.....	71
Tabela 3.4 Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores envolvidos na extração das espécies de Cr.....	74
Tabela 3.5 Resultados dos ensaios de recuperação das espécies de As (n = 3).....	77
Tabela 3.6 Concentração de As total e espécies de As em pescados e CRMs e MR empregando o método proposto (média $\pm$ desvio padrão, $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	77
Tabela 3.7 Resultados dos ensaios de recuperação das espécies de Cr (n = 3).....	80
Tabela 3.8 Concentração de Cr total, espécies de Cr em pescados e CRMs e MR empregando o método proposto (média $\pm$ desvio padrão, $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	81
Tabela 4.1 Parâmetros instrumentais em especiação por LC-ICP-MS.....	88
Tabela 4.2 Planejamento Experimental Doehlert para otimização do método de CPE.....	95
Tabela 4.3 Resumo dos parâmetros analíticos desenvolvidos para o método de CPE de Cr(VI).....	97
Tabela 4.4 Estudos da interferência de alguns íons na determinação de Cr(VI).....	98
Tabela 4.5 Avaliação da exatidão do método CPE-Cr(VI) por UV-Vis e FAAS nos CRMs (NIST 2701) e (NIST 695) por FAAS, resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média $\pm$ desvio padrão, n =3) e as recuperações (%)......	99

Tabela 4.6 Aplicação do método separação e pré-concentração desenvolvido para determinação de Cr total e Cr(VI) em amostras de fertilizantes orgânicos pelo método de (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)..... 101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema da funcionalização da fase sólida e estrutura do material sintetizado .....	25
Figura 1.2 Estudo do pH na extração de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por SPE e determinação por MIP OES .....	28
Figura 1.3 Gráfico de pareto para o planejamento fatorial completo .....	30
Figura 1.4 Médias marginais(a) pH versus RM (b) [Tampão] versus RM e (c) vazão de eluição versus RM com um nível de confiança de 95 % .....	31
Figura 2.1 Esquema de adsorção superficial no precipitado de cromato de prata .....	43
Figura 2.2 a) Gráfico de valores preditos <i>versus</i> valores observados b) gráfico de resíduos <i>versus</i> valores preditos para modelo quadrático usando a resposta múltipla .....	51
Figura 2.3 Superfícies de resposta obtidas a partir planejamento Box-Behnken para as variáveis .....	52
Figura 3.1 Separação das espécies de As usando a fase móvel 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> diluída em 1% (v/v) de metanol (pH 8,0).....	69
Figura 3.2 Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de Cr. Injeção de 50 µL de Cr(III) e Cr(VI) usando fase móvel composta de 15 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 5 mM EDTA + 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> com (—) pH = 7,0; 25 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 5mM EDTA + 1mM NaOH com (—) pH = 8,0 e 5 mM EDTA (—) com pH = 10,0.....	70
Figura 3.3 Superfícies de resposta obtida a partir do planejamento experimental Doehlert para as variáveis temperatura <i>versus</i> tempo em a) camarão e b) molusco bivalve .....	73
Figura 3.4 Superfícies de resposta obtida a partir do planejamento Box-Behnken para as variáveis: a) [EDTA] <i>versus</i> Massa e b) Tempo <i>versus</i> temperatura..	75
Figura 3.5 Cromatogramas das espécies de As em a) DOLT-5, b) DORM-4, c) TORT-3 d) 1566b, e) IPEN, f) cação, g) molusco bivalve e h) camarão .....	78

Figura 3.6 Cromatogramas das espécies de Cr em a) DOLT-5, b) DORM-4, c) TORT-3 d) 2701, e) Sardinha, f) Molusco Bivalve, g) camarão NatuBr e h) Camarão SSB.....	82
Figura 4.1 Esquema do procedimento de extração em ponto nuvem (CPE)...	91
Figura 4.2 Avaliação da massa da amostra de fertilizantes orgânicos provenientes de resíduo de curtume (FO1 e FO2) na extração de Cr(VI) e determinação espectrofotométrica (n = 3) .....	94
Figura 4.3 Dependência de Cr(VI) com a temperatura de (a) CRM 2701 e (b) fertilizante orgânico (n = 3) .....	94
Figura 4.4 Superfície de resposta do planejamento Doehlert para temperatura <i>versus</i> NaCl no método de CPE.....	96
Figura 4.5 Amostra de extrato de cromo de fertilizante orgânico (FO6) com ISO 1701-2 e extração alcalina e padrão 25 µg L <sup>-1</sup> Cr(VI) por LC-ICP-MS.100	

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO E ESPECIAÇÃO DE CROMO E ARSÊNIO EM AMOSTRAS AGRÍCOLAS. A produção agrícola sustentável é indispensável para atendimento da demanda crescente por alimentos, sendo essencial o controle nutricional e a avaliação dos riscos associados à contaminação por elementos tóxicos em matrizes agrícolas e aquícolas. Nesse contexto, a presente tese avaliou novas metodologias de pré-concentração e especiação química com o emprego de diferentes técnicas de determinação, como a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS), a espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e a espectrofotometria (UV-VIS) para análise de amostras de pescados e fertilizantes orgânicos. A extração em fase sólida (SPE) para determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn em carne e peixe e a coprecipitação para determinação de As e Cd em peixes foram os procedimentos de pré-concentração empregados para aumentar a sensibilidade do MIP OES. Planejamento experimental foi aplicado na otimização dos métodos, sendo a veracidade avaliada com análise de materiais de referência certificados (CRMs) e comparação com outra técnica instrumental, ICP-MS. Os valores encontrados foram concordantes, demonstrando a viabilidade dos métodos. A especiação química de As e Cr em pescados foi realizada por LC-ICP-MS, sendo a extração das espécies definida com aplicação de planejamentos experimentais. A veracidade dos procedimentos foi verificada pela análise de quatro CRMs e em teste de adição e recuperação. Por fim foi desenvolvido método para especiação de Cr(VI) em fertilizante orgânico. Este método se mostrou adequado para determinação por FAAS e UV-VIS, com limites de detecção respectivamente 1,4 e 1,8 mg kg<sup>-1</sup>, inferiores ao valor máximo permitido pela legislação brasileira, 2,0 mg kg<sup>-1</sup>. A veracidade do método foi avaliada com o emprego de dois CRMs e por teste de adição e recuperação.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PRECONCENTRATION METHODS FOR DETERMINATION OF TRACE ELEMENTS AND SPECIATION OF CHROMIUM AND ARSENIC IN AGRICULTURAL SAMPLES. Agricultural sustainable production is indispensable to meet the growing demand for food and nutritional control. The risk assessment associated with contamination by toxic elements in agricultural and aquaculture matrices are essential. In this context, the present thesis evaluated new methodologies for pre-concentration and chemical speciation methods using different determination techniques, such as microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES), liquid chromatography associated with inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS), flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and spectrophotometry (UV-VIS) for analysis of fish and organic fertilizer samples. Solid-phase extraction (SPE) for As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn determination in meat and fish, and co-precipitation for As and Cd determination in fish were the pre-concentration procedures used to increase the sensitivity of the MIP OES. Experimental planning was applied to optimize the methods, being the trueness evaluated with analysis of certified reference materials (CRMs) and comparison with another instrumental technique, ICP-MS. The values found were in agreement with reference values, demonstrating the feasibility of the methods. The chemical speciation of As and Cr in fish was performed by LC-ICP-MS, and the extraction of the species was defined using experimental designs. The trueness of the procedures was verified by the analysis of four CRMs and with addition and recovery experiment. Finally, a method for speciation of Cr(VI) in organic fertilizer was developed. The method proved to be adequate for determination by FAAS and UV-VIS. It provided limits of detection of 1.4 and 1.8 mg kg<sup>-1</sup>, respectively, lower than 2.0 mg kg<sup>-1</sup>, the maximum value allowed by the Brazilian regulation. The trueness of the method was evaluated using two CRMs and the addition and recovery technique.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
Aquicultura no Brasil .....	4
Fertilizante orgânico .....	5
Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).....	7
Métodos de pré-concentração .....	7
CPE .....	8
SPE .....	8
Coprecipitação .....	8
Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) .....	11
Cromatografia líquida aliada ao espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS) .....	11
Arsênio (As) .....	13
Cromo (Cr) .....	15
Capítulo 1.....	16
<i>Determinação de Elementos Traço em Amostras de Carne e Peixe por MIP OES empregando a Extração em Fase Sólida (SPE) .....</i>	<i>17</i>
1.1 INTRODUÇÃO .....	17
1.2 OBJETIVO .....	22
1.3 EXPERIMENTAL .....	22
1.3.1 Equipamentos .....	22
1.3.2 Reagentes, soluções padrão e amostras .....	24
1.3.3 Síntese, caracterização da fase sólida e preparação da coluna.....	25

1.3.4	Estratégia de otimização.....	25
1.3.5	Preparo de amostra .....	26
1.3.6	Procedimento de extração em fase sólida (SPE).....	26
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	27
1.4.1	Otimização das condições de SPE .....	27
1.4.2	Parâmetros analíticos .....	29
1.4.3	Validação e aplicação .....	32
1.5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	39
Capítulo 2	.....	40
	<i>Avaliação da Contaminação de As e Cd em Peixes por MIP OES Através da Coprecipitação</i> .....	37
2.1	INTRODUÇÃO .....	37
2.2	OBJETIVO .....	40
2.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	40
2.3.1	Equipamentos .....	40
2.3.2	Amostras, soluções e reagentes .....	42
2.3.3	Preparo de amostra .....	43
2.3.4	Procedimento de coprecipitação .....	43
2.3.5	Estratégia de otimização .....	44
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
2.4.1	Otimização das condições de coprecipitação .....	44
2.4.2	Parâmetros analíticos .....	49
2.4.3	Validação e aplicação .....	50
2.5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	52
Capítulo 3	.....	54
	<i>Desenvolvimento de Método para Especificação Química de As em frutos do mar e Cr em amostras agrícolas por LC-ICP-MS</i> .....	54
3.1	INTRODUÇÃO .....	54
3.2	OBJETIVO .....	57
3.3	PARTE EXPERIMENTAL .....	57
3.3.1	Equipamentos .....	57

3.3.2	Amostras, soluções e reagentes .....	60
3.3.3	Preparo da amostra .....	61
3.3.3.1	Determinação de As e Cr Total .....	61
3.3.3.2	Especiação de As em pescados .....	61
3.3.3.3	Especiação de Cr em amostras agrícolas .....	62
3.3.4	Estratégia de otimização .....	62
3.3.4.1	Espécies de As .....	62
3.3.4.2	Espécies de Cr .....	63
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
3.4.1	Determinação de As e Cr Total .....	63
3.4.2	Otimização da separação cromatográfica das espécies de As e Cr .....	64
3.4.3	Otimização das condições de extração das espécies de As e Cr .....	67
3.4.3.1	As .....	67
3.4.3.2	Cr .....	69
3.4.4	Parâmetros analíticos .....	72
3.4.5	Validação e aplicação .....	72
3.4.5.1	As .....	72
3.4.5.2	Cr .....	74
3.5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	78
Capítulo 4	.....	79
	<i>Especiação de Cromo em Fertilizantes Orgânicos por Extração em Ponto Nuvem e Otimização por meio de Planejamento Experimental Doehlert como Suporte para Aspectos Legislativos .....</i>	<i>79</i>
4.1	INTRODUÇÃO .....	79
4.2	OBJETIVO .....	82
4.3	PARTE EXPERIMENTAL .....	82

4.3.1	Equipamentos .....	82
4.3.2	Reagentes, soluções padrão .....	83
4.3.3	Amostras .....	84
4.3.4	Método de digestão para determinação de Cr total .....	85
4.3.5	Extração alcalina de Cr(VI) .....	85
4.3.6	Extração em ponto nuvem .....	85
4.3.7	Análise LC-ICP-MS .....	85
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	86
4.4.1	Otimização do método .....	86
4.4.1.1	Método de extração alcalina .....	86
4.4.1.2	Método de extração em ponto nuvem (CPE) .....	88
4.4.2	Parâmetros analíticos .....	91
4.4.3	Interferência e efeito de matriz .....	92
4.4.4	Validação do método .....	93
4.4.5	Método comparativo LC-ICP-MS .....	94
4.4.6	Cr(VI) em fertilizante orgânico .....	95
4.5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	101
	CONCLUSÕES FINAIS .....	102
	REFERÊNCIAS.....	104

## INTRODUÇÃO

A estimativa do crescimento da população mundial segundo a ONU é de 9,7 bilhões de pessoas em 2050 [1]. O principal desafio será a alimentação desta população, pois a parcela de pessoas em zonas urbanas tem crescido notavelmente. Desta forma, não somente é necessário aumentar a produção agrícola quanto a sustentabilidade das atividades é definitivamente indispensável para atendimento da demanda por alimentos [1,2].

O Brasil é considerado um dos grandes produtores mundiais agropecuários, tendo o PIB do setor apresentado crescimento de 2% em 2020. Nesse cenário, o uso de fertilizantes orgânicos é uma das alternativas empregadas para o aumento da produção agrícola. Outro mercado importante para o País é o referente à aquicultura, na qual se inclui a produção de frutos do mar ricos em proteínas e aminoácidos essenciais, além de ser fonte alimentar de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (ômega-3), minerais essenciais (cálcio, fósforo, zinco, ferro, selênio e iodo) e vitaminas (A, B e D), com importantes funções para a saúde humana [3,4].

Contaminantes em fertilizante orgânico e pescado, como As, Cr, Cd, Pb e Hg também se apresentam como preocupantes. De forma geral, a concentração dos elementos tóxicos varia de acordo com a matriz. Para os fertilizantes, a procedência dos materiais que os geraram; no caso dos pescados, essa variação é determinada pela contaminação antropogênica e pela espécie, dentre outros fatores [5,6]. Alguns órgãos reguladores têm estabelecido limites máximos permitidos, com intuito de assegurar a saúde pública. Um dos parâmetros de avaliação da qualidade dos pescados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução - RDC N° 487, IN 88 de 26/03/2021 (ANVISA, INSTRUÇÃO NORMATIVA-IN N° 88, DE 26 DE MARÇO DE 2021, Pub. L. No. IN-88, Diário Oficial da União (2021), no Brasil, é o teor total dos elementos. No entanto, sabe-se que apenas esse dado não fornece informações sobre a biodisponibilidade, essencialidade ou toxicidade dos elementos nos organismos vivos em geral. Como

exemplo, a Resolução 487 já estabelece limites máximos de As inorgânico em fórmulas infantis e alimentos para lactantes [7].

O desenvolvimento de métodos analíticos para a análise elementar de pescados e fertilizantes é fundamental para a qualidade e a segurança alimentar. Para essa finalidade, verifica-se que a predominância do uso de técnicas espectrométricas. A espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) é uma das técnicas espectroscópicas que tem sido empregadas para análise de pescados. Plasma de nitrogênio, fornecido por um gerador de nitrogênio a partir de compressor de ar é utilizado como fonte de excitação, o que reduz o custo operacional. Por outro lado, em função da menor temperatura do plasma de nitrogênio quando comparado ao plasma de argônio, efeitos de matriz mais elevados são observados quando as determinações são realizadas por MIP OES [8]. Diversos autores apresentam novas alternativas para viabilizar o uso dessa técnica para diferentes tipos de amostras. Nesse sentido, entre outras estratégias estão sendo explorados estudos de pré-concentração para aumento da sensibilidade [9–11].

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem capacidade multi-elementar e ampla faixa linear, sendo a alta sensibilidade sua principal vantagem [12]. O ICP-MS tem sido explorado para a quantificação de elementos essenciais e tóxicos presentes em baixas concentrações em fertilizantes e pescados [13–15]. A grande maioria das aplicações é voltada para a determinação dos teores totais dos analitos. A separação e determinação das espécies químicas presentes em uma amostra, conhecida como especiação química apresenta-se como cada vez mais necessária por fornecer informações relacionadas à forma como o elemento encontra-se na matriz, estado de oxidação e suas formas orgânicas e inorgânicas [16].

## **OBJETIVO GERAL**

Esta tese teve como objetivo principal desenvolver métodos de pré-concentração para elementos traço e especiação química de As e Cr para análise de amostras agronômicas, pescados e fertilizantes orgânicos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver um método empregando a extração em fase sólida (SPE) a fim de aumentar a sensibilidade da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) na determinação de elementos traço em amostra de peixes e carnes;
- Avaliar a contaminação de As e Cd em peixes por MIP OES após metodologia de coprecipitação com cromato de prata;
- Explorar a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS) na especiação de As e Cr em amostras agrícolas;
- Desenvolver método para especiação Cr(VI) em fertilizante orgânico por meio da extração em ponto nuvem (CPE) e determinação por espectrometria de absorção molecular UV-VIS e FAAS.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Aquicultura no Brasil**

Estudo realizado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que a produção mundial de pescado proveniente da aquicultura chegue a 102 milhões de toneladas em 2025 [4]. Neste cenário, dentre os países da América Latina, o Brasil deverá registrar o maior crescimento, seguido pelo México (54,2%) e pela Argentina (53,9%). É possível que o incremento da pesca e aquicultura, registrada até este período, seja maior que 100%. Paralelamente, o consumo per capita de pescado no mundo tende a aumentar, principalmente na Ásia, Oceania, América Latina e Caribe.

Desde a década de 1990 a aquicultura ganhou força como forma sustentável de atender o aumento do consumo de pescado e procurando evitar o impacto negativo da pesca extrativista. Em 2018, peixes, crustáceos e moluscos representavam cerca de 71% dos organismos cultivados e 38% do total de pescado (captura e cultivado), totalizando 81 milhões de toneladas. Destaque para peixes, com a produção de 54 milhões de toneladas, 47,40% do total da produção aquícola. Com preços mais acessíveis, a aquicultura apresenta-se como alternativa para a população de menor renda, para melhoria do bem-estar nas questões relativas à nutrição, emprego e renda [2,4,6].

Para o crescimento sustentável da aquicultura é necessário desenvolver bases científicas e tecnológicas sólidas para solucionar as demandas do setor produtivo. Em todo o território nacional, as condições para crescimento da produção de inúmeras espécies são boas, especialmente as relacionadas a mercado, tecnologias, condições climáticas e insumos, entretanto, a produção aquícola nacional continua concentrada na tilapicultura, cujo desempenho tem sido expressivo. Além da tilápia, o tambaqui, camarão, tambacu, tambatinga, dentre outras espécies também têm a sua participação nesse setor da economia. O Brasil reúne as condições de se tornar grande produtor de

pescado, substituir importações, ingressar ativamente no mercado global e alavancar o mercado doméstico [2,4,6,17].

### **Fertilizante orgânico**

Com relação ao uso do solo para atividades agrícolas e agroindustriais, a agropecuária foi a atividade que mais cresceu nos últimos anos. A média do Produto Interno Bruto (PIB) do setor, que representa a soma em valores monetários de todos os bens e serviços produzidos no país, registrou alta de 2,0% em 2020, aumentando a participação no PIB de 5,1% em 2019, para 6,8% em 2020, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Em relação às exportações, no Brasil o agronegócio apresenta crescimento expressivo sendo que a balança comercial do agronegócio registrou valor recorde no mês de agosto de 2021 motivada, principalmente, pela alta dos preços internacionais das commodities exportadas pelo Brasil. O valor exportado foi de US\$ 10,90 bilhões, 26,7% superior ao exportado em agosto de 2020. A participação do agronegócio no total das exportações do país representa 40,1% (agosto/2021). O crescimento da produtividade agrícola está diretamente relacionado ao crescimento populacional. Em 2050 a população mundial poderá chegar a 9,7 bilhões de pessoas e, para atender a essa demanda, a ampliação na produção de alimentos torna-se necessária [1,18,19]. Nesse aspecto, a utilização de fertilizantes como complemento à disponibilidade de nutrientes pelo solo é fundamental para assegurar a manutenção e o crescimento das lavouras. Em 2020, cerca de 40,6 milhões de toneladas de fertilizantes foram comercializados para o plantio no Brasil, dos quais apenas 6,4 milhões de toneladas foram produzidas no país [20].

Desta maneira, o aumento da produção interna, juntamente ao uso eficiente de fertilizantes, principalmente os macronutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) é essencial e estratégico. Por um lado, para a diminuição da dependência dos preços dos produtos agrícolas em relação aos preços estabelecidos pelos países exportadores de fertilizantes e/ou matéria-prima e por outro, para que seja obtida máxima

produtividade econômica das culturas, minimizando as perdas de nutrientes para o ambiente. O agricultor brasileiro tem buscado patamares produtivos mais altos, criando demanda por tecnologias que resultem em aumento de eficiência no uso de insumos. Paralelamente, as discussões sobre o impacto ambiental do uso de fertilizantes, apesar das conotações negativas, forçam o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis de manejo da adubação.

O ambiente está propício a novos conceitos, ideias e tecnologias de produto e de manejo em toda a cadeia produtora devido, principalmente, à renda gerada no agronegócio brasileiro e a necessidade de se adequar às exigências internacionais para a exportação dos produtos agrícolas. Também deve ser considerada a contínua expansão da demanda por nutrientes e conseqüente necessidade de aumento de seu fornecimento para o setor agrícola, o que abre boas perspectivas para a viabilização de novas fontes que vêm sendo estudadas e parcialmente supridas pelo mercado com a proposição de novos fertilizantes e exploração de fontes que até pouco tempo não eram economicamente interessantes.

Dentre as diferentes estratégias que têm sido adotadas está o uso de fertilizantes orgânicos, produzidos a partir de resíduos industriais e o uso de novas tecnologias para a produção de fertilizantes de maior eficiência ou de menor custo de produção. No entanto, essas estratégias demandam acompanhamento e informações analíticas voltadas ao controle de contaminantes e aos teores de nutrientes. Dentro deste contexto está a determinação do MAPA, através da Instrução Normativa n. 7 (2016), que define 2 mg/kg como o máximo admitido de Cr(VI) [21].

### **Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)**

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) é uma técnica multielementar muito empregada para determinação de macro e micronutrientes em uma ampla variedade de matrizes, apresentando características

positivas tais como capacidade multielementar, bons LODs e ampla faixa linear. O uso da radiação micro-ondas como uma fonte de plasma foi proposto na década de 50. No entanto, somente em 2012 a versão comercial do equipamento foi disponibilizada pela *Agilent Technologies* [8]. Este instrumento apresenta como componentes principais o sistema de introdução de amostra, fonte de excitação, sistema de alimentação do plasma e detector, operando com potência de 1000 W em uma cavidade Hammer [22].

Na MIP OES, um plasma de nitrogênio gasoso é empregado para as análises. O uso do N<sub>2</sub> reduz significativamente os custos, quando comparado a outras técnicas que utilizam argônio, como ICP OES e ICP-MS. A temperatura do plasma de nitrogênio, de aproximadamente 5.000 K, é inferior às temperaturas obtidas com plasma de Ar, por volta de 9.000 K. Devido a este fato, alguns efeitos de matriz são descritos quando do emprego do MIP OES, sendo que vários autores investigaram estes efeitos para os mais diversos analitos [8,23,24]. A determinação de analitos presentes em fertilizantes inorgânicos e pescados empregando o MIP OES também foi objeto de diferentes publicações [25–29].

### **Métodos de pré-concentração**

Muitos trabalhos na literatura têm descrito estratégias para minimizar os efeitos de matriz e possibilitar a análise em matrizes complexas por MIP OES [8], pois a técnica apresenta baixo custo e grande versatilidade. Estratégias convencionais e novos métodos focados em calibração e correção de sinal possibilitam minimizar eficientemente estes efeitos [30–35]. Os métodos de pré-concentração se apresentam como excelentes alternativas tanto para a remoção da matriz quanto ao melhoramento da sensibilidade. Nesse contexto, diversos métodos têm sido descritos, possibilitando a determinação de elementos presentes em quantidades traço por MIP OES. Dentre os métodos propostos, destacam-se a extração em ponto nuvem (CPE), também empregada para especificação química (Tabela 1), a extração em fase sólida (SPE) e a coprecipitação.

### ***CPE***

A extração em ponto nuvem é um método que se baseia no fenômeno em que uma solução aquosa de surfactante se torna turva por adição de uma substância apropriada ou por alteração de algumas de suas propriedades, como temperatura ou pressão. O surgimento da turbidez ocorre porque o surfactante atinge seu ponto nuvem. Neste ponto, a solução original separa-se em duas fases distintas: uma rica em surfactante e de pequeno volume, contendo o analito orgânico ou inorgânico desejado e uma outra, aquosa, de grande volume, que deve ser descartada [36].

### ***SPE***

A extração em fase sólida (SPE) é também um método bastante empregado na separação/pré-concentração de analitos. Esta estratégia consiste na separação líquido-sólido, sendo que a amostra líquida passa através de um material absorvente a uma vazão constante e os analitos ficam retidos nessa fase absorvente para posteriormente serem eluídos em pequenos volumes e a seguir direcionados para a determinação. Foram encontrados poucos trabalhos na literatura que empregam a SPE para determinações por MIP OES [37–40].

### ***Coprecipitação***

A coprecipitação é processo pelo qual substâncias solúveis se incorporam aos precipitados durante a sua formação. A depender da natureza do precipitado pode ocorrer por formação de cristal misto isomorfo, oclusão, ou adsorção superficial. Entre as vantagens da técnica estão o baixo custo, simplicidade e possível aplicação a vários analitos simultaneamente [41]. Na literatura somente um trabalho foi encontrado descrevendo a aplicação da coprecipitação para determinação de analitos por MIP OES [9].

**Tabela 1. Trabalhos empregando a extração em ponto nuvem (CPE) para especificação química de As e Cr**

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>Complexante</b>	<b>Surfactante</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
Cr(III) Cr(VI)	Água do Mar	APDC e 8-HQ	Triton X-114	1,4 0,65	FAAS	[42]
Cr(III) Cr(VI)	Amostras ambientais e biológicas	APDC	Triton X-114	0,6 10,6	FAAS	[43]
Cr(III) Cr(VI)	Águas	Br-PF	Triton X-110	0,010	GF AAS	[44]
As (III) As (V)	Águas de torneira, cabelos e unhas	Molibidato	Triton X-114	0,010	GF AAS	[45]
Cr(III) Cr(VI)	Água do rio, mar e efluente	DDTC	Triton X-114	3,4 5,2	HPLC-UV	[46]
As (III) As (V)	Água	APDC	Triton X-114	2,0	ICP-OES	[47]
Cr(III) Cr(VI)	Água	PMBP	Triton X-110	0,021	GF AAS	[48]
Cr(III) Cr(VI)	Água	2-Hidroxi-1-naftaldeido	Triton X-110	0,18	FAAS	[49]
Cr(III) Cr(VI)	Soro humano	PAN	Triton X-114	0,02	GF AAS	[50]

APDC: pirrolidina ditiocarbamato de amônio; 8-HQ: 8-hidroxiquinolina; Br-PF: dibromofenilfluorona; DDTC: Dietilditilcarbamato de sódio; PMBP: 1-fenil-3-metil-4-benzoil-5-pirazolona; PAN: 1-(2-piridilazo)-2-naftol.

## **Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)**

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é uma técnica multielementar que além de ter uma ampla faixa linear apresenta alta sensibilidade, possibilitando a determinação de elementos presentes em níveis traço e a análise isotópica [12,51,52]. De forma geral, o ICP-MS é composto por um sistema de introdução de amostra, sistema de focalização de íons positivos e de separação de massas e detector. O Argônio é o gás utilizado para formação e manutenção do plasma. Uma das grandes limitações dessa técnica está relacionada a interferência espectral, caracterizada pela presença de íons poliatômicos que possuem mesma razão massa/carga ( $m/z$ ) do analito [53–55]. Por exemplo, o isótopo mais abundante do Cr é o de massa 52, que pode ser afetado pelo  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$  presente no meio. Para o As com massa 75, espécie monoisotópica, pode ocorrer interferência devido a presença das espécies poliatômicas  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  entre outras, afetando a confiabilidade da análise, pois essas espécies podem suprimir ou aumentar o sinal analítico. No entanto, o emprego de dessolvadores no sistema de introdução de amostra, equações matemáticas, cela de reação e colisão, e por discriminação de energia cinética (KED), são estratégias eficientes que permitem a minimização desses problemas [53,56–59].

## **Cromatografia líquida aliada ao espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS)**

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica utilizada para separação de componentes de uma mistura, proporcionando a separação físico-química de um alto número de compostos similares contidos em uma solução, com eficiência, rapidez e detectabilidade [60–62]. Um sistema de LC é composto por reservatórios de fase móvel, ao qual é comumente empregado um filtro para garantir que somente o eluente seja introduzido no sistema, uma bomba capaz de produzir uma vazão constante e reprodutível, um medidor de pressão e um injetor [60,61]. E este sistema é acoplado

a uma coluna e um detector, que tem a função de identificar e quantificar os analitos que são eluídos da coluna cromatográfica [63].

As colunas cromatográficas de separação se apresentam como uma das partes mais importante do sistema de LC. Divididas em colunas de fase normal e fase reversa, são encontradas comercialmente em uma grande diversidade. As colunas de fase normal são confeccionadas em sílica e possuem grupos polares como amino, ciano, diol e fenila. Essas colunas são comumente empregadas na separação de substâncias que apresentam baixa afinidade com a água, como por exemplo gorduras, lipídeos e óleos. Já as colunas de fase reversa são constituídas por partículas de sílica recoberta por hidrocarbonetos com diferentes cadeias alifáticas (C-2, C-8, C-18) e permitem a análise de substâncias hidrofílicas e lipofílicas. Além da versatilidade, as colunas de fase reversa apresentam outras vantagens como não comprometimento reprodutibilidade, menor adsorção irreversível e eluição facilitada no modo gradiente [60,63].

A cromatografia líquida é definida como um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura através da distribuição desses componentes entre duas fases, móvel e estacionária. Mediante a passagem de uma fase móvel pela estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, sendo seletivamente retido pela parte estacionária, resultando em componentes com diferentes tempos de retenção, o que possibilita sua separação e detecção [60,62]. Para as espécies de As e Cr, a coluna de troca aniônica é comumente empregada para a separação. Em coluna de troca aniônica, a fase estacionária é caracterizada por uma fase ligada com grupos de amina quaternária, carregada positivamente [64]. As espécies de As e Cr carregadas negativamente serão retidas na coluna por troca aniônica e eluidas por um ânion concorrente presente na fase móvel. Este método é descrito em diversas publicações voltadas à amostras agrícolas [65–69].

O acoplamento LC-ICP-MS é uma estratégia que alia um método de separação com alta seletividade e uma técnica de detecção altamente sensível e tem sido bastante utilizada na análise de especiação química [68–73]. A especiação química é campo que tem se consolidado ao longo dos anos. Trata-se de um tipo de análise que envolve a separação e a determinação das formas ou espécies químicas de um elemento.

A IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) define a especiação química de um elemento como um procedimento de avaliação da distribuição do metal entre várias formas ou espécies em uma determinada matriz. De forma sistemática os níveis de estrutura em que as espécies podem ser consideradas distintas são abordadas, tais como a composição isotópica, o estado eletrônico ou de oxidação, os complexos inorgânicos e orgânicos, os compostos organometálicos e, finalmente, as macromoléculas [16].

A essencialidade ou toxicidade dos elementos é dependente da sua forma química, podendo variar bastante entre a forma orgânica ou inorgânica [16,74]. Em especiação química, além do emprego de técnicas com alta seletividade e sensibilidade ser de essencial importância, os principais parâmetros que implicam numa boa separação das espécies, precisão e sensibilidade estão relacionados também ao preparo de amostra [75].

### **Arsênio (As)**

O arsênio é um elemento abundante na crosta terrestre, principalmente como o mineral arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), de ocorrência natural associada a depósitos vulcânicos e ambiente geoquímico [76,77]. Por outro lado, as fontes antrópicas de contaminação são principalmente devido à atividade de mineração, queima de carvão, fundição de cobre e uso de fertilizantes e herbicidas [78–80]. As formas mais comuns de As na natureza se apresentam como arsenito ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) e arseniato ( $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  e  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ), ou seja, As(III) e As(V), respectivamente, o que leva à presença majoritária dessas espécies nos tecidos vegetais [81].

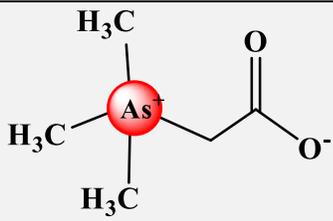
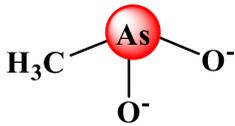
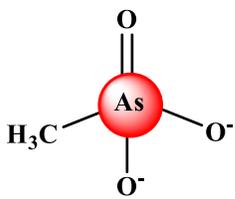
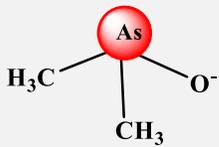
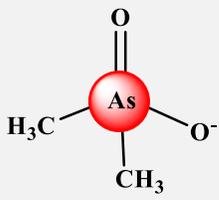
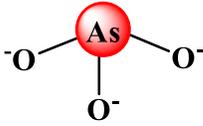
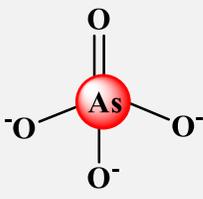
A especiação química de arsênio nas mais distintas matrizes (peixe, sangue, planta, alimentos) é um tema bastante explorado atualmente, basicamente por dois aspectos: a toxicidade deste elemento para os seres vivos e as diferentes formas que esse pode se apresentar, as quais são mais ou menos tóxicas. Dentre as formas que esse semimetal pode ser encontrado se destacam os arsenoaçúcares, as formas metiladas de As, as formas redox, arsenobetaína, arsênio-peptídeos e as arsênio-proteínas [82–85].

Os pescados têm uma forte tendência de apresentar altas concentrações de As, característica muitas vezes atribuída à similaridade das propriedades químicas do arsênio ao fósforo e ao nitrogênio [86]. Dentre as principais formas de As presentes em pescados, apresentadas na Tabela 2, se destaca a arsenobetaína (AsB) espécie principal encontrada nesse tipo de matriz, porém também podem ser encontradas as espécies metiladas (MMA e DMA), além das formas inorgânicas [86–88].

As recentes pesquisas e progressos em química analítica evidenciam que a determinação do teor total de um elemento, embora essencial, é limitada, uma vez que não é suficiente para fornecer informações a respeito da biodisponibilidade, toxicidade, essencialidade, transporte e características físico-químicas, informações potencialmente obtidas em análises de especiação [89].

O mesmo elemento a depender da sua forma pode ser essencial ou tóxico; espécies inorgânicas de arsênio, As(III) e As(V), são as mais tóxicas, enquanto as formas orgânicas DMA e MMA, são relativamente menos tóxicos e a arsenocolina (AsC) e arsenobetaína (AsB) são consideradas não tóxicas.

*Tabela 2. Espécies químicas de As comumente encontradas em pescados*

Espécie química	Abreviatura	Estrutura química
arsenobetaina	AsB	
monometil arsênio	MMA(III)	
monometil arsênio	MMA(V)	
dimetil arsênio	DMA(III)	
dimetil arsênio	DMA(V)	
arsenito	As(III)	
arsenato	As(V)	

## **Cromo (Cr)**

Cromo é largamente usado na indústria química para diferentes aplicações, tais como pigmentação, e curtimento na indústria de couro e na produção química, tais como síntese química e catálise. Como resultado, diferentes espécies de cromo podem ser liberadas no ambiente (solo, superfície e águas superficiais) e disponibilizados para os alimentos [71]. Cromo pode estar presente em várias formas químicas e em diferentes estados de oxidação. No entanto, apenas as formas tri e hexavalente são estáveis e encontradas no ambiente. O Cr(III) é considerado um micronutriente essencial na dieta e utilizado como suplemento na nutrição humana e animal. Todavia, foi demonstrado que o Cr(III) pode causar eczemas a baixas concentrações e danos ao DNA em sistemas de cultura celular [90,91]. Além disso, a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) recentemente reconsiderou sua essencialidade [92].

Por outro lado, Cr(VI) é muito mais tóxico que o Cr(III) tanto em exposição crônica quanto aguda e seus compostos são regulados por diversas legislações, tanto da União Européia quanto da legislação brasileira (IN n. 7, 12/04/2016) [21]. O Cr(VI) é extremamente tóxico após inalação ou exposição oral, com efeitos no sistema respiratório e gastrointestinal, fígado, rim, sistema imunológico e possivelmente para o sistema sanguíneo, podendo causar dermatite e ulcerações na pele (ATSDR, 1998), além de ser classificado como carcinogênico classe I pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) [93,94].

O comportamento do Cr(III) e Cr(VI) em meio aquoso é afetado principalmente pelo potencial redox e pH. Em meio ácido, com o alto potencial redox do Cr(VI)/Cr(III), a estabilização do Cr(III) é favorecida. Em condições alcalinas, o potencial redox decresce, indicando a estabilização do Cr(VI). Assim, termodinamicamente o Cr(VI) deve estar presente apenas a valores de pH relativamente elevados [95]. Por outro lado, o Cr(III) pode estar presente em várias formas em função do pH. Devido à elevada mobilidade e toxicidade do Cr(VI) diversas diretrizes e normas tratam de sua determinação e controle. Como exemplo,

a IN n. 7 do MAPA indica o método EPA 7196 para a determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico (USEPA, 1995) [21,96,97]. O método colorimétrico é baseado na espectrofotometria por difenilcarbazida, no qual o Cr(VI) reage com a difenilcarbazida em meio altamente ácido gerando o complexo Cr-difenilcarbazona, detectado a 540 nm. Apesar da relativa seletividade, pode sofrer interferências de Mo(VI), Cu(II), Fe(III), Hg(II) e V(V) [98]. Além disso, a extração do Cr(VI) em meio básico promove também a extração do ácido húmico, de coloração escura, muitas vezes presente em amostras orgânicas, impossibilitando a determinação colorimétrica.

Já para os pescados, tanto o Cr(III) quanto o Cr(VI) são absorvidos pelos organismos, sendo que grande parte do Cr(VI) é reduzido a Cr(III) através de reações redox que ocorrem no metabolismo do organismo, assim, em geral, a espécie de Cr predominante nesse tipo de amostra é o Cr(III) [95,99]. Ao contrário dos fertilizantes orgânicos, não existe uma legislação vigente no Brasil que estabeleça limites máximos para os pescados, mesmo o Cr apresentando toxicidade a depender de seu estado de oxidação.

## Capítulo 1

### *Determinação de Elementos Traço em Amostras de Carne e Peixe por MIP OES empregando a Extração em Fase Sólida (SPE)*

#### 1.1 INTRODUÇÃO

Garantir a segurança do alimento é uma das principais preocupações em todo o mundo, uma vez que elementos potencialmente tóxicos, como As, Cd, Cr, Hg, e Pb podem se acumular no organismo e causar danos a saúde humana. O acúmulo desses analitos pode afetar o sistema gastrointestinal, neurológico, renal ou hepático dos indivíduos, como mulheres grávidas e crianças, os mais suscetíveis à toxicidade desses analitos [102,103]. Por outro lado, Fe, Cu e Zn são considerados micronutrientes essenciais que atuam no desenvolvimento dos seres vivos. No entanto, a exposição prolongada a esses analitos pode ser prejudicial ao organismo [104]. A origem de um contaminante no alimento pode ocorrer durante o transporte, uso de embalagem inadequada, ou durante o processo de preparo e produção [105].

O controle de qualidade e segurança na cadeia de suprimento alimentar exige uma metodologia confiável que seja rápida e facilmente transferível. A quantificação dos elementos em matrizes como carne e peixe requer um tratamento prévio das amostras, visto que as análises feitas por técnicas espectrométricas geralmente necessitam que as amostras se encontrem na forma líquida [105,106].

Técnicas espectroanalíticas como a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) se apresenta como eficiente em função da frequência analítica, fácil manuseio e, principalmente, baixo custo. No entanto, apresenta algumas limitações, como relativa baixa sensibilidade, além da suscetibilidade à interferência de matriz no sinal dos analitos [34,54,107–109].

O emprego de métodos de pré-concentração, como exemplo, a extração em fase sólida (SPE) apresenta-se como alternativa para ampliar o espectro de aplicação do MIP OES. Trata-se de método de pré-tratamento que se fundamenta no fato que os analitos da amostra, geralmente na forma líquida, são distribuídos e retidos em uma fase sólida (resina, carvão, sílica, etc), sendo a seguir recuperados por eluição. A distribuição do analito é influenciada pelas forças intermoleculares entre as fases, alterando a retenção e a eluição [110–112]. Outras importantes vantagens deste tipo de extração é a separação de fases geralmente rápida, baixo consumo de solvente e facilidade de automatização [113,114].

Ayala e Takagai [38] determinaram Sr e Ni em amostras ambientais de água por um procedimento de SPE online e determinação por MIP OES. Os autores empregaram como fase sólida uma resina funcionalizada com butilciclohexano para o Sr e outra com dimetilglioxima para o Ni. O procedimento apresentou limites de detecção de 0,25 e 3,56  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Sr e Ni, respectivamente. Outra alternativa proposta pelos mesmos autores utilizaram uma sílica micro magnética com grupos funcionais de dietil sulfona imobilizados como fase sólida na extração de Sr em amostras de águas ambientais, sendo obtidos limites de quantificação de 0,59  $\mu\text{g L}^{-1}$  [37].

A extração dispersiva em fase sólida foi utilizada para a determinação de ouro em amostras de água por MIP OES, alcançando limites de detecção de 5  $\text{ng L}^{-1}$  usando magnetita de grafeno óxido (m-GO) como material absorvente [40]. Anteriormente, Zhang et al. (2012) desenvolveram um procedimento para determinar Sb e As em níveis traço em recipientes de vidro e embalagens [39]. A coluna de pré-concentração foi embalada com poli (aril éter cetona) contendo grupos carboxila (PEK-L). O procedimento proposto apresentou limites de detecção de 0,27  $\mu\text{g L}^{-1}$  para As e 0,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Sb. Na Tabela 1.1 são descritos alguns estudos recentes sobre extração em fase sólida proposto para determinação de contaminantes inorgânicos em alimentos e amostras biológicas.

Um novo material sintetizado por Costa et al. (2017) apresentou características marcantes devido às suas propriedades físico-químicas e, portanto, pode ser aplicado como suporte catalítico, adsorvente, sensor, entre outros [115]. O material mesoporoso denominado PABA-MCM-41, pertence à família M41S e tem uma estrutura hexagonal com ácido p-aminobenzoico incorporado nesta estrutura. A MCM-41 é uma sílica porosa de tamanho uniforme e arranjo hexagonal, utilizada como peneira molecular.

A capacidade de absorção de íons metálicos do composto PABAMCM-41 foi avaliada com a imobilização de terras raras ( $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ ). De acordo com os resultados, os íons metálicos são coordenados pelo grupo  $\text{COO}^-$ . Esta hipótese pode ser comprovado por análise de difração de raio-X. A banda obtida atribuída ao grupo carbonil aumentou de 50 para  $66 \text{ cm}^{-1}$  na presença de Eu e Tb. Os autores estabeleceram que o grupo carbonil promove a transferência de carga entre PABA e íons metálicos [115].

Os métodos que envolvem a SPE são promissores, porém fatores que afetam o processo de extração, tais como pH, concentração de tampão, fluxo de amostragem e fluxo de eluição devem ser estudados. Nesse sentido, uma análise multivariada é uma opção atraente para otimizar os processos de pré-concentração [41,116]. A aplicação de ferramentas quimiométricas possibilita a análise das interações nos fatores estudados e redução no número de experimentos, resultando em menor consumo de reagentes e menor tempo de análise [117,118]. Entre as diferentes possibilidades de otimização multivariada, os planejamentos fatorial de dois níveis [119], Doehlert [65], Box-Behnker [120], e composto central [121] são os principais planejamentos utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos.

Dado as características da fase sólida PABA-MCM-41, como um alto fator de absorção e a escassez de trabalhos empregando SPE-MIP OES, um método de extração em amostras de carnes e peixes foi desenvolvido, visando a determinação do As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por MIP OES. Os parâmetros que afetam a extração

dos analitos por SPE foram estudados através da otimização multivariada usando um planejamento fatorial.

**Tabela 1.1. Estudos empregando SPE na extração de elementos traço em alimentos e amostras biológicas**

Fase sólida	Amostra	Analitos	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	FE	Instrumento	Referência
MMAD <sup>1</sup>	Carnes e alimentos para bebês	Cd, Cu, Cr, Pb, Zn	0,12-0,16	100	FAAS	[122]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GO <sup>2</sup>	Sangue e urina	Cu, Cd, Pb	0,016-0,157	25	ICP-MS	[123]
Batofenantrolina/GO <sup>2</sup>	Fígado de porco e frango, Água	Pb, Cd, Zn, Cr, Cu	0,06-0,25	25	ICP OES	[124]
ZFONT <sup>3</sup>	Cabelo humano e molusco	Co, Ni, Mn, Cd	0,09-3,7 ng L <sup>-1</sup>	120	ICP-MS	[110]
AAPTS <sup>4</sup>	Água do mar e leite em pó	Ni, Cu, Ga, Cd, Pb, Bi	0,009-0,041	30	ICP-MS	[15]
MWCNTs/BTAO <sup>5</sup>	Água e tomate	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	0,7–2,6	100	FAAS	[125]
MWCNTs /tartrazina	Avelã, bebida em pó de laranja	Cd e Pb	0,8 e 6,6	40	FAAS	[126]
GO-DVB-VA <sup>6</sup>	Água do mar, cânhamo, pimenta	Pb, Cd, Cu, Ni, Co	0,37–2,39	40	FAAS	[127]
PABA-MCM-41	Peixes, carne ovina e bovina	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn	0,04-4 $\mu\text{g g}^{-1}$	26	MIP OES	Este trabalho

FE: Fator de enriquecimento; LD: Limite de detecção; <sup>1</sup> poli[N-(3-metil-1H-indol-1-il)-2-metacrilamida-co-2-acrilamido-2-metil-1-propano sulfônico ácido divinilbenzeno]; <sup>2</sup> óxido de grafeno; <sup>3</sup> nanotubos magnético ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; <sup>4</sup> N-[2-aminoetil]-3-aminopropiltrimetoxisilano; <sup>5</sup> nanotubo de carvão multicamada (MWCNTs) impregnado com 2-(2-benzotiazolilazo)orcinol; <sup>6</sup> alilamina magnética modificada óxido de grafeno-poli(vinil acetato-co-divinilbenzeno).

## **1.2 OBJETIVO**

O objetivo deste capítulo foi avaliar a combinação da extração em fase sólida e a técnica de detecção MIP OES para determinação de elementos traço em amostras de carnes e peixes, explorando planejamento experimental fatorial de dois níveis para estabelecer as condições ótimas da SPE.

## **1.3 PARTE EXPERIMENTAL**

### ***1.3.1 Equipamentos***

A determinação dos elementos avaliados foi realizada empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (4200 MP-AES, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). Em conjunto a esse equipamento, foi utilizado um gerador de nitrogênio (Agilent Technologies, model 4107). Os parâmetros instrumentais empregados para o MIP OES são apresentados na Tabela 1.2.

Para fins comparativos realizou-se a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por ICP-MS (Modelo 7800, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) equipado com uma célula de reação e colisão pressurizada com He de alta pureza (99,9999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil). Argônio de alta pureza (99,999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado para geração do plasma, nebulização e gás auxiliar. Na Tabela 1.3 são apresentados todos os parâmetros operacionais instrumentais e isótopos monitorados. As amostras de carne e peixe foram secas em liofilizador (Modelo EC, MicroModulyo, Nova York, NY), moídas criogenicamente (Moínho MA775, Marconi, Piracicaba, Brasil) e digeridas com ácido nítrico em forno de micro-ondas (Milestone, Ethos 1, Sorisole, Itália).

**Tabela 1.2. Parâmetros instrumentais empregados na determinação As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por MIP OES**

Parâmetros Instrumentais	Condições de operação					
	As	Zn	Hg	Cd	Pb	Cr
Frequência do micro-ondas (MHz)	2450					
Potência do plasma (kW)	1					
Tempo de estabilização (s)	10					
Correção de sinal de fundo	Automática					
Tempo de integração (s)	8					
Nebulizador	OneNeb					
Câmara de nebulização	Ciclônica, duplo-passo					
Posição de observação do plasma	-10	-30	-10	0	120	0
Vazão gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,55	0,5	0,75	0,95
Comprimento de onda (nm)	193,695 (I)	213,857 (I)	253,652 (I)	228,802 (I)	405,781 (I)	425,433 (I)

**Tabela 1.3. Parâmetros instrumentais empregados na determinação As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por ICP-MS**

Parâmetros Instrumentais	Condições de operação
Potência do plasma (W)	1.550
Profundidade de amostragem (mm)	10
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Vazão de gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,42
Velocidade de nebulização (rps)	0,1
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de integração (s)	0,3
Vazão do gás de diluição (L min <sup>-1</sup> )	0,6
Célula de colisão e reação Vazão do He (mL min <sup>-1</sup> )	4,5
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott, duplo-passo
Isótopos	<sup>75</sup> As, <sup>111</sup> Cd, <sup>52</sup> Cr, <sup>63</sup> Cu, <sup>200</sup> Hg, <sup>206</sup> Pb, <sup>64</sup> Zn e <sup>103</sup> Rd (Padrão interno)

### ***1.3.2 Reagentes, soluções padrão e amostras***

As amostras de carne (bovina e ovina) e filé de tilápia foram adquiridas no mercado local (São Carlos, SP, Brasil). Em seguida, as amostras foram liofilizadas e moídas em moinho criogênico para redução do tamanho das partículas. Dois materiais de referência certificados, CRM 1577c fígado bovino (NIST, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA) e DOLT-5 fígado de cação (Canadian National Research Council - NRC, Canada), e um material de referência de fígado bovino (MR-Agro E3001a, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA) [128], foram utilizados para o desenvolvimento do procedimento SPE e para a determinação dos analitos por MIP OES.

Toda vidraria foi mantida em  $\text{HNO}_3$  10% v v<sup>-1</sup> por pelo menos 24 h e lavada com água ultrapura antes do uso. Todas soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, resistividade 18.2 M $\Omega$  cm (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA).

As amostras foram digeridas em meio  $\text{HNO}_3$  (Synth, Diadema, SP, Brasil) purificado em um sistema de destilação sub-boiling Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m m<sup>-1</sup> (Sigma, Aldrich, Alemanha).

Os seguintes reagentes também foram utilizados : ácido bórico (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil), acetato de sódio (Dinâmica Química contemporânea Ltda, Indaiatuba, SP, Brasil), tris (Biosolve). As soluções padrão foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de As, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e Cd (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça). Como padrão interno foi utilização a solução de Rh (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça) .

### 1.3.3 Síntese, caracterização da fase sólida e preparação da coluna

A funcionalização e caracterização da fase sólida foi descrita por Costa et al. (2017) [115]. O material mesoporoso PABA-MCM-41, sintetizado a partir do ácido p-aminobenzóico modificado com 3-(trietoxisilil)-propil isocianato, tem tamanho de partícula 3,61 nm.

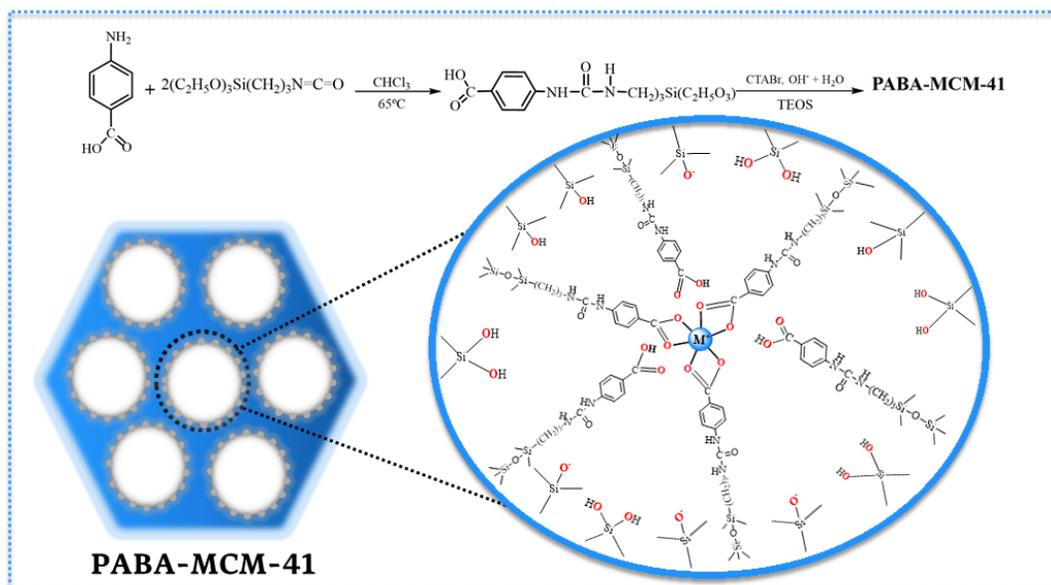


Figura 1. 1 Esquema da funcionalização da fase sólida e estrutura do material sintetizado, adaptado de (Costa et al., 2017) [115].

Minicoluna com 9,5 cm de comprimento e 4,0 mm diâmetro interno foi construída com tubo de Tygon. Cerca de 0,2 g de sílica foi misturado com 0,02 g de PABA-MCM-41. Posteriormente, lã de vidro foi colocada nas duas extremidades da minicoluna para manter o material empacotado no local. Primeiramente solução de  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi passada pela minicoluna, seguido de água. A lavagem com  $\text{HNO}_3$  promove a lixiviação de qualquer traço de metal que pudesse estar presente na fase sólida previamente empacotada. Todas as conexões foram feitas em acrílico.

### 1.3.4 Estratégia de otimização

O procedimento de SPE foi otimizado através da aplicação de planejamento fatorial ( $2^4$ ) com ponto central, que avaliou as condições críticas de extração. Os fatores e níveis estudados foram: pH (8,5, 9,0 e 9,5), concentração de tampão (0,001, 0,0505 e 0,1 mol L<sup>-1</sup>), vazão de amostragem (2,0, 4,0 e 6,0 mL min<sup>-1</sup>) e vazão de eluição (2,0, 4,0 e 6,0 mL min<sup>-1</sup>).

Para obter uma única condição experimental para a extração simultânea de todos os elementos, foi empregada a resposta múltipla (RM), obtida por meio da intensidade de emissão dos elementos. A RM é dada pela Equação 1.1, onde  $A_s$  é a intensidade experimental obtida para este analito e o  $IAs$  é a maior intensidade obtida para o analito  $A_s$  no bloco experimental. O mesmo cálculo foi realizado para os demais analitos estudados (Ferreira, 2015).

$$MR = \frac{As}{IAs} + \frac{Cd}{ICd} + \frac{Cr}{ICr} + \frac{Cu}{ICu} + \frac{Hg}{IHg} + \frac{Pb}{IPb} + \frac{Zn}{IZn} \quad \text{Equação 1.1}$$

### 1.3.5 Digestão das amostras

Para o procedimento de digestão, 100 mg de amostra, em triplicata, foi pesada diretamente nos frascos de Teflon modificado (PFA, polifluoralcoxi) próprios do forno de micro-ondas. A seguir foram adicionados 8,0 mL de HNO<sub>3</sub> (4,2 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m/m), transferidos para o rotor do equipamento e iniciado o programa de digestão, que consistiu no seguinte programa de aquecimento: (1) 15 min a 120°C, (2) 20 min até atingir 180°C e (3) 20 min a 180°C. Um sensor infravermelho controlava a temperatura em um dos frascos. Posteriormente, os digeridos foram diluídos para 30,0 mL com água e conduzidos à determinação dos analitos por ICP-MS.

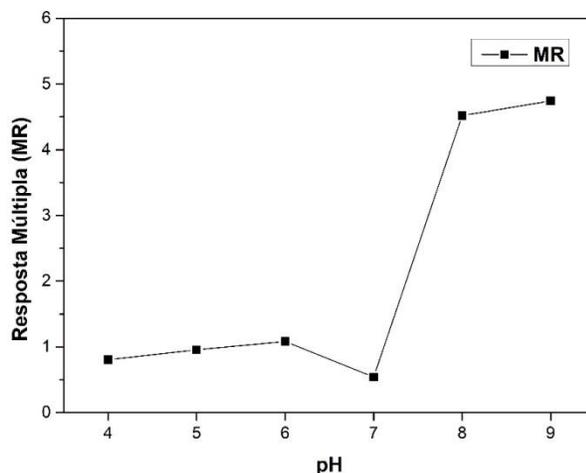
### ***1.3.6 Procedimento de extração em fase sólida (SPE)***

A fase sólida sintetizada foi empacotada na minicoluna PABA-MCM-41 previamente descrita, sendo a pré-concentração executada com a passagem em fluxo da solução contendo os analitos. Nesse sistema, a minicoluna foi lavada com água entre as etapas de pré-concentração, sem perder eficiência [129]. As soluções contendo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn foram preparadas em meio aquoso e o pH 9,5 ajustado com tampão borato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Com o auxílio da bomba peristáltica, a solução passava pela minicoluna e os íons metálicos ficavam retidos. Em seguida, os íons eram eluídos com  $0,75 \text{ mL}$  de  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo armazenados para posterior análise por MIP OES.

## **1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***1.4.1 Otimização das condições de SPE***

Primeiramente, o pH foi otimizado de forma univariada. Dentre os vários fatores que influenciam a SPE, o pH é o mais crítico, pois a interação entre o analito e a fase sólida é fortemente dependente da forma dos elementos e do ligantes na fase sorvente (Fig. 1.2). Em meio ácido, a complexação dos analitos não é favorável, uma vez que o grupo (-COOH) presente na estrutura do material responsável por esta retenção está em sua forma protonada. No meio básico, o grupo (-COO<sup>-</sup>) pode interagir com os analitos, proporcionando melhor eficiência de extração.



**Figura 1.2 Estudo do pH na extração de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn por SPE e determinação por MIP OES**

**Condições: 20 mL do digerido da amostra, 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  analito, 0,001 mol  $\text{L}^{-1}$  tampão.**

Matriz experimental para o planejamento fatorial de dois níveis contendo 19 experimentos foi utilizada para otimizar as condições de extração dos analitos e os fatores pH, concentração do tampão [tampão], Vazão de amostragem (VA) e vazão eluição (VE) foram estudados. A Tabela 1.4 mostra o planejamento fatorial aplicado com valores reais e codificados e a resposta analítica em função da resposta múltipla (RM).

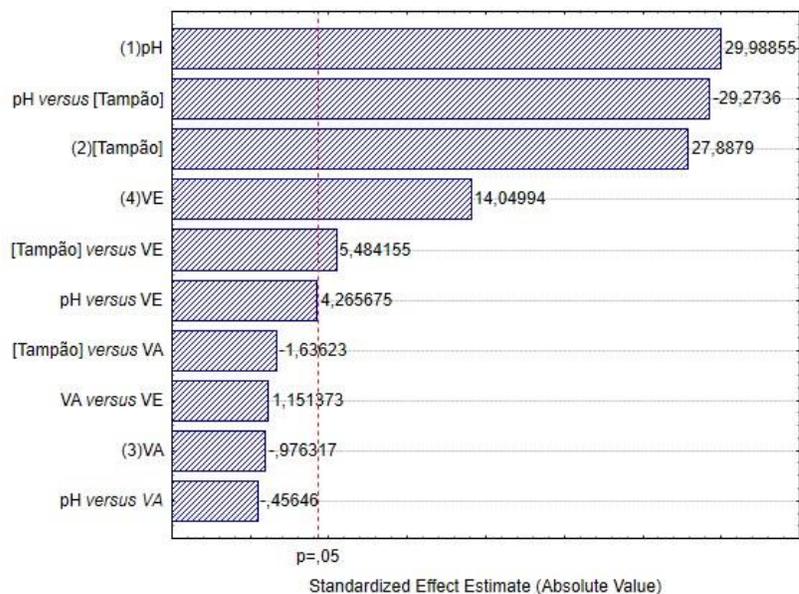
Após o processamento dos dados, a avaliação das melhores condições para a SPE foi realizada por meio da análise do gráfico de Pareto (Fig.1.3), observando-se a significância de todos os fatores e suas interações a um nível de confiança de 95%. A magnitude dos efeitos é representada por colunas e a linha vertical indica significância estatística em  $p = 0,05$ . Desta forma, os fatores com valores que excedem a linha vertical são estatisticamente significativos em um nível de confiança de 95%. Por meio da análise dos dados obtidos no gráfico de Pareto, verificou-se que o fator de vazão de amostragem e as interações pH *versus* VE; [tampão] *versus* VA; VA *versus* VE; e pH *versus* VA não foram significativos. Além disso, o fator VA não foi significativo; indicando que qualquer condição avaliada pode ser empregada.

**Tabela 1.4** Matriz do planejamento fatorial de dois níveis para otimização dos fatores envolvidos no procedimento de SPE-MIP OES para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn

Exp	pH	[Tampão] (mol L <sup>-1</sup> )	VA (mL min <sup>-1</sup> )	VE (mL min <sup>-1</sup> )	RM
1	8,50 (-1)	0,0010 (-1)	2,00 (-1)	2,00 (-1)	1,066
2	9,50 (1)	0,0010 (-1)	2,00 (-1)	2,00 (-1)	4,784
3	8,50 (-1)	0,1000 (1)	2,00 (-1)	2,00 (-1)	3,968
4	9,50 (1)	0,1000 (1)	2,00 (-1)	2,00 (-1)	4,286
5	8,50 (-1)	0,0010 (-1)	6,00 (1)	2,00 (-1)	1,011
6	9,50 (1)	0,0010 (-1)	6,00 (1)	2,00 (-1)	3,937
7	8,50 (-1)	0,1000 (1)	6,00 (1)	2,00 (-1)	4,305
8	9,50 (1)	0,1000 (1)	6,00 (1)	2,00 (-1)	4,276
9	8,50 (-1)	0,0010 (-1)	2,00 (-1)	6,00 (1)	0,891
10	9,50 (1)	0,0010 (-1)	2,00 (-1)	6,00 (1)	5,122
11	8,50 (-1)	0,1000 (1)	2,00 (-1)	6,00 (1)	5,814
12	9,50 (1)	0,1000 (1)	2,00 (-1)	6,00 (1)	5,751
13	8,50 (-1)	0,0010 (-1)	6,00 (1)	6,00 (1)	0,999
14	9,50 (1)	0,0010 (-1)	6,00 (1)	6,00 (1)	6,094
15	8,50 (-1)	0,1000 (1)	6,00 (1)	6,00 (1)	5,283
16	9,50 (1)	0,1000 (1)	6,00 (1)	6,00 (1)	5,250
17	9,00 (0)	0,0505 (0)	4,00 (0)	4,00 (0)	4,544
18	9,00 (0)	0,0505 (0)	4,00 (0)	4,00 (0)	4,725
19	9,00 (0)	0,0505 (0)	4,00 (0)	4,00 (0)	4,461

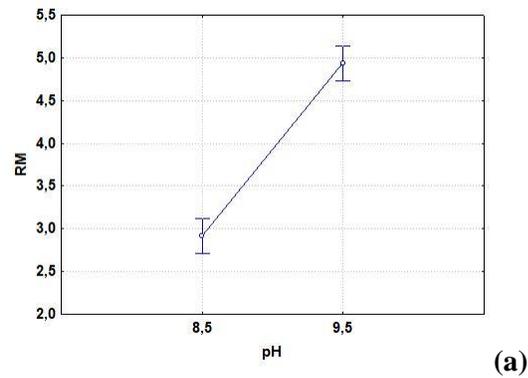
Exp: Experimentos; VA: Vazão de amostragem (mL min<sup>-1</sup>); VE: Vazão de eluição (mL min<sup>-1</sup>);

RM: resposta múltipla.

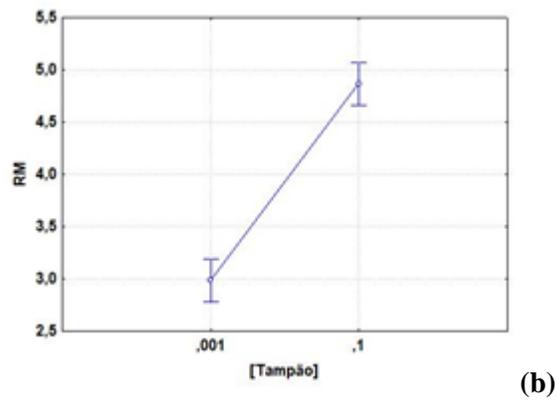


**Figura 1.3 Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo**

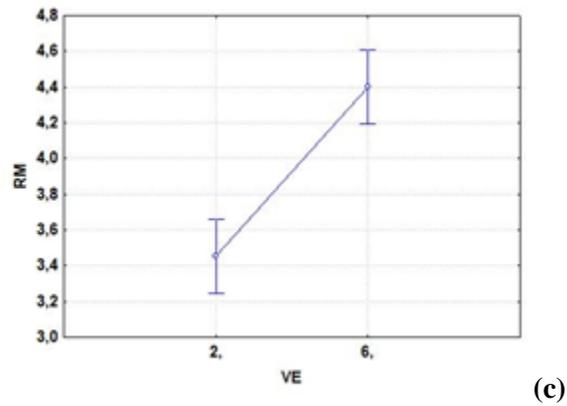
Conforme descrito anteriormente, o pH é um dos fatores mais críticos na eficiência de extração e melhores resultados foram obtidos em meio alcalino (pH 9,5). Valores de pH mais elevados não foram estudados devido à possível formação de hidróxidos dos analitos e à hidrólise da sílica, causando danos à mini-coluna. No nível alto, o fator VE apresentou melhor resultado ( $6 \text{ mL min}^{-1}$ ), esperava-se que em vazões menores fossem obtidas maiores eficiências de extração, pois a amostra teria melhor contato com a fase sólida, incrementando o sinal analítico. No entanto, observou-se que a cinética de complexação dos analitos é muito rápida e, portanto, esse tempo de interação com a fase sólida não foi tão significativo nem para a amostragem nem para a eluição. Com a validação do modelo, estabeleceu-se as condições para SPE dos analitos através da análise dos gráficos das médias marginais. Melhores sinais foram obtidos ao se trabalhar nos níveis superiores, ou seja, maior eficiência de extração foi alcançada quando se aplicou as condições pH9,5, concentração de tampão de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e vazão de amostragem e eluição  $6 \text{ mL min}^{-1}$ . A Figura 1.4 resume as condições estabelecidas para o método.



(a)



(b)



(c)

Figura 1.4 Médias marginais(a) pH versus RM (b) [Tampão] versus RM e (c) vazão de eluição versus RM com um nível de confiança de 95 %

### 1.4.2 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos do procedimento proposto foram estabelecidos nas condições otimizadas, determinados de acordo com às recomendações da União International de Química Pura e Aplicada (IUPAC)[130,131]. As curvas foram tratadas de acordo com regressão ponderada, pois é uma estratégia opcional do software de MIP OES. Desta forma o ajuste ponderado foi usado na obtenção das curvas analíticas no experimento. As correções nas curvas de calibração evitam erros associados com (a) ruído de leitura, que é constante; (b) ruído de disparo de fótons, que é proporcional à raiz quadrada do sinal; e (c) variação do ruído, que é proporcional ao sinal. Na prática, o ruído frequentemente aumenta à medida que a concentração do analito aumenta. Isso significa que os pontos de calibração devem ter pesos desiguais no cálculo final. Os cálculos ponderados são usados na curva pelo software, permitindo que a linha da curva de calibração seja ajustada onde os erros são menores. Portanto, como o desvio padrão aumenta, a ponderação de um ponto diminuirá [131–133].

O ajuste ponderado foi aplicado às curvas de calibração. Basicamente, se os pontos individuais são denotados por  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots (x_i, y_i)$ , como de costume e os desvios padrão correspondentes são  $s_1, s_2, \dots s_i$ , então os pesos individuais,  $w_1, w_2, \dots w_i$  são dados pela Eq. (1.2):

$$\text{Pesos:} \quad w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad \text{Equação 1.2}$$

Ao usar o divisor  $n$  no denominador da equação, os pesos foram escalados de forma que sua soma seja igual ao número de pontos no gráfico. Isso simplifica os cálculos subsequentes. A inclinação e a interceptação da linha de regressão são dadas por:

Inclinação ponderada: 
$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}$$
 Equação 1.3

e

Intercepto ponderado: 
$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w$$
 Equação 1.4

Nessas equações,  $\bar{y}_w$  e  $\bar{x}_w$  representam as coordenadas do centroide ponderado, através do qual a linha de regressão ponderada deve passar. Essas coordenadas são fornecidas, como esperado, por  $\bar{x}_w = \sum_i \frac{w_i x_i}{n}$  e  $\bar{y}_w = \sum_i \frac{w_i y_i}{n}$ .

Os desvios padrão (erro padrão) dos coeficientes (inclinação,  $s_{bw}$ , interceptação,  $s_{aw}$ ) para a regressão ponderada podem ser calculados pelas Equações (1.5) e (1.6), respectivamente:

$$S_{bw} = \frac{S_{(y/x)w}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$
 Equação 1.5

$$S_{aw} = S_{(y/x)w} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum ((x_i - \bar{x})^2)}}$$
 Equação 1.6

Os intervalos de confiança para esses coeficientes também são calculados analogamente pela Equação (1.7).

$$IC = x_{0w} \pm t_{(n-2)} \times s_{x_{0w}}$$
 Equação 1.7

As curvas de calibração foram lineares na faixa de concentração do limite de quantificação até 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , resultando nas próximas equações: Intensidade = 20,63  $\pm$  4,73 [As,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] + 7,82  $\pm$  1,24; Intensidade = 182,68  $\pm$  5,85 [Zn,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - 98,02  $\pm$  8,47; Intensidade = 339,25  $\pm$  4,61 [Cd,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - 143,73  $\pm$  18,92; Intensidade = 2697,47  $\pm$  160,79 [Cu,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - 373,44  $\pm$  4,12; Intensidade = 8,60  $\pm$  0,30 [Hg,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - 0,15  $\pm$  0,02; Intensidade = 12,68  $\pm$  0,69 [Pb,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] + 1,14  $\pm$  0,01; Intensidade = 1394,44  $\pm$  11,97 [Cr,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - 127,0  $\pm$  4,14.

O fator de enriquecimento foi determinado pela razão entre as inclinações das

curvas de calibração com pré-concentração e sem pré-concentração e os valores encontrados foram os seguintes: 25 (As, Cd e Cr); 26 (Cu); 7 (Hg); 16 (Pb); e 26 (Zn).

O limite de detecção (LOD) foi definido como  $LOD = 3s/S$  (onde  $s$  é o desvio padrão obtido do sinal de 10 medições em branco e  $S$  é a inclinação da curva analítica, esses valores já convertidos em relação (m/m): As  $2,7 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cd:  $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cr:  $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cu:  $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ , Hg:  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , Pb:  $4 \mu\text{g g}^{-1}$  e Zn:  $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ . O limite de quantificação (LOQ) foi determinado a partir da razão de dez vezes o desvio padrão do sinal em branco pela inclinação da curva de calibração, esses valores, convertidos na relação m/m foram: As:  $9,6 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cd:  $2,8 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cr:  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ , Cu:  $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ , Hg:  $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , Pb:  $13,3 \mu\text{g g}^{-1}$  e Zn:  $3,9 \mu\text{g g}^{-1}$ .

### ***1.4.3 Validação e aplicação***

A veracidade do procedimento de digestão foi avaliada pela análise do fígado de cação (DOLT-5), fígado bovino (CRM 1577c) e material de referência de fígado bovino (MR-Agro E3001a), com valores de recuperação variando de 83% a 102% por ICP-MS. As recuperações obtidas no SPE-MIP OES são apresentadas na Tabela 1.5. A avaliação estatística, por meio do teste t de Student, mostrou que não há diferença significativa entre os valores obtidos e o valores certificados com nível de confiança de 95%, confirmando a veracidade do procedimento desenvolvido.

O procedimento foi aplicado à pré-concentração dos analitos por SPE-MIP OES nas amostras de peixes e carnes e os resultados foram comparados com os valores obtidos por ICP-MS para complementar a avaliação da veracidade do método (Tabela 1.6). A avaliação estatística por meio do teste t pareado com nível de confiança de 95% não demonstrou diferença estatística entre os valores obtidos pelo método SPE-MIP OES e os obtidos pela análise direta no ICP-MS, considerando que o t calculado foi 3,54 (Cr), 3,34 (Cu), 2,01 (Zn), enquanto o t-crítico foi 4,30.

As amostras apresentaram frações de massa que variaram de  $0,83$  a  $3,45 \mu\text{g g}^{-1}$

Cr; 1,43 e 4,45  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu e 17,7 e 118  $\mu\text{g g}^{-1}$  Zn. As frações de massa de As, Cd, Hg e Pb ficaram abaixo do LOQ e não foi possível quantificar esses analitos nas amostras avaliadas (Tabela 1.6). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2021)[7], por meio da resolução 487 e IN 88, recomenda como 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  os limites máximos de 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  As, 0,05  $\text{mg kg}^{-1}$  Cd e 0,1  $\text{mg kg}^{-1}$  Pb para carnes. Já para peixes 1,0  $\text{mg kg}^{-1}$  As, 0,1  $\text{mg kg}^{-1}$  Cd, 1,00  $\text{mg kg}^{-1}$  Hg (peixes predadores), 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  Hg (peixes não predadores) e 0,3  $\text{mg kg}^{-1}$  Pb. O Comitê do Codex sobre Contaminantes em Alimentos (CODEX, 2018) na resolução CXS 193-1995 [134], estabelece 0,1  $\text{mg kg}^{-1}$  como limite máximo para Pb em bovinos, suínos e ovinos e 0,3  $\text{mg kg}^{-1}$  para peixes. Os valores máximos permitidos de Hg são 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  para peixes e 1,0  $\text{mg kg}^{-1}$  para peixes predadores. Das amostras analisadas, apenas o Pb na amostra de carne ovina apresentou-se acima do valor permitido, sendo necessários maiores estudos para se conhecer a origem desta contaminação, que pode ser proveniente da nutrição animal ou do processamento.

A fração de massa de Cu, Cd, Cr, Pb e Zn relatada por Pilarczyk (2014) na carne bovina da Polônia[135], foi de 0,45-0,811, 0,018-0,022, 0,066-0,099, 0,188-0,229, 25,8-48,3  $\text{mg kg}^{-1}$  respectivamente. Ambushea et al. (2012) relataram uma concentração de Cr 11,4-499  $\text{ng g}^{-1}$ , Cd 10,2-31,7  $\text{ng g}^{-1}$  e Pb <0,43  $\text{ng g}^{-1}$  em músculo bovino da África do Sul[136]. Gallego Ríos et al. (2017) determinaram as concentrações de As, Cu, Hg, Pb e Zn, em amostras de peixes, obtendo 0,22-0,27, 0,42-0,5, 0,39-0,48, 0,61-0,73  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente[109]. Bosch et al. (2016) publicaram uma revisão em que a concentração de As, Cd, Pb e Hg foi avaliada em diferentes tipos de peixes de diferentes países [137]. O arsênio em peixes da Itália apresentou concentração variando de 30,76-59,91  $\text{mg kg}^{-1}$ , enquanto nos peixes da Croácia os valores de As ficaram entre 8,08-23,30  $\text{mg kg}^{-1}$ . Em peixes da Itália, foram relatadas concentrações de Cd entre 0,05-0,11  $\text{mg kg}^{-1}$ . Para o Pb em peixes da Nigéria, a concentração relatada foi de 0,46  $\text{mg kg}^{-1}$ , da África do Sul foi de 0,8  $\text{mg kg}^{-1}$ , do Brasil foi 2,15  $\text{mg kg}^{-1}$ , da Sicília 0,32  $\text{mg kg}^{-1}$  e da Bulgária 4,31  $\text{mg kg}^{-1}$ .

No caso do Hg na Itália 0,43-1,09 mg kg<sup>-1</sup>, Inglaterra 0,21-2,65 mg kg<sup>-1</sup>, Nova Jersey 0,35-1,83 mg kg<sup>-1</sup> e Seychelles 0,06-0,59 mg kg<sup>-1</sup>. Como pode ser visto, os resultados deste trabalho são comparáveis aos relatados na literatura. Muitas das amostras de carnes e peixes analisadas em outros países não estão nos padrões de consumo humano de acordo com os valores estabelecidos pela ANVISA (2021) e pelo Codex (2018). No entanto, para alguns analitos como As, Cr e Hg, uma análise de especiação é necessária para conhecer a verdadeira toxicidade das amostras.

**Tabela 1.5 Determinações da fração de massa (mg kg<sup>-1</sup> u µg kg<sup>-1</sup>) em fígado bovino (CRM 1577c), fígado de cação (DOLT-5) e fígado bovino (MR-Agro E3001a) pelo método proposto SPE-MIP OES (média ± desvio padrão, n = 3 e recuperação)**

Analito	Fração de massa (µg kg <sup>-1</sup> ou mg kg <sup>-1</sup> )					
	Fígado de cação DOLT-5		Fígado Bovino CRM 1577c		Fígado bovino RM-Agro E3001a	
	Valor Certificado	Valor Determinado	Valor Certificado	Valor Determinado	Valor Referência	Valor Determinado
<b>As</b>	34,6 ± 2,4 <sup>a</sup>	31,5 ± 2,5 <sup>a</sup> (91)	19,6 ± 1,4 <sup>b</sup>	<9,6 <sup>a</sup>	15,22 <sup>b</sup>	<9,6 <sup>a</sup>
<b>Cd</b>	14,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,10 <sup>a</sup> (90)	97,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	< 2,76 <sup>a</sup>	96,03 <sup>b</sup>	< 2,76 <sup>a</sup>
<b>Cr</b>	2,35 ± 0,58 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,20 <sup>a</sup> (103)	53 ± 14 <sup>b</sup>	< 0,1 <sup>a</sup>	-	< 0,1 <sup>a</sup>
<b>Cu</b>	35,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	29,8 ± 2,9 <sup>a</sup> (85)	275,2 ± 4,6 <sup>a</sup>	280,5 ± 13,4 <sup>a</sup> (102)	246,26 <sup>a</sup>	229,3 ± 11,2 <sup>a</sup> (93)
<b>Hg</b>	0,44 ± 0,18 <sup>a</sup>	<1,5 <sup>a</sup>	5,36 ± 0,17 <sup>b</sup>	<1,5 <sup>a</sup>	-	<1,5 <sup>a</sup>
<b>Pb</b>	0,162 ± 0,032 <sup>a</sup>	<13,3 <sup>a</sup>	62,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	<13,3 <sup>a</sup>	77,32 <sup>b</sup>	<13,3 <sup>a</sup>
<b>Zn</b>	105,3 ± 5,4 <sup>a</sup>	101,7 ± 5,7 <sup>a</sup> (88)	181,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	172,7 ± 5,6 <sup>a</sup> (95)	164,44 <sup>a</sup>	137,0 ± 12,6 <sup>a</sup> (83)

a: mg kg<sup>-1</sup> b: µg kg<sup>-1</sup>

**Tabela 1.6** Aplicação do procedimento SPE-MIP OES para fração de massa (mg kg<sup>-1</sup>) de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn em amostras de peixes e carnes e comparação com a determinação de ICP-MS (média ± desvio padrão, n = 3)

Amostras	SPE-MIP OES						
	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )						
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Zn
<b>Ovino</b>	<9,6	< 2,8	3,420 ± 0,277	4,452 ± 0,218	<1,5	< 13,3	98,8 ± 10,5
<b>Bovino</b>	<9,6	< 2,8	0,835 ± 0,011	1,834 ± 0,219	<1,5	< 13,3	118,0 ± 18,4
<b>Tilápia</b>	<9,6	< 2,8	0,910 ± 0,141	1,432 ± 0,217	<1,5	< 13,3	17,73 ± 1,78
Amostras	ICP-MS						
	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )						
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Zn
<b>Ovino</b>	0,0050 ± 0,0011	<0,002	3,530 ± 0,059	4,698 ± 0,587	<0,1	0,179 ± 0,050	91,20 ± 7,06
<b>Bovino</b>	0,0035 ± 0,0009	0,0036 ± 0,0008	0,774 ± 0,043	1,744 ± 0,011	<0,1	0,061 ± 0,008	133,73 ± 8,36
<b>Tilápia</b>	0,015 ± 0,002	<0,002	0,867 ± 0,068	1,249 ± 0,061	<0,1	0,251 ± 0,060	18,94 ± 0,79

## **1.5.CONCLUSÕES PARCIAIS**

Neste capítulo foi desenvolvido um método de separação/pré-concentração baseado na extração em fase sólida dos analitos As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn aplicados em amostras de carnes e peixes e determinação por MIP OES. O planejamento fatorial de dois níveis permitiu estabelecer as melhores condições para os fatores estudados, utilizando assim menos experimentos e de maneira mais rápida do que a análise univariada.

O método apresentou boa exatidão, verificada pela análise de CRM, e comparado aos dados obtidos pelo ICP-MS. O LOD e o LOQ foram baixos, mas, ainda assim, superiores aos limites máximos permitidos pela legislação. Uma forma de contornar esse problema seria aliar a pré-concentração à geração de hidreto no caso do As ou geração de vapor frio para o Hg. O método representa uma alternativa econômica para a determinação de elementos traço quando comparado a técnicas instrumentais de alto custo como ICP OES e ICP-MS.

## Capítulo 2

### *Avaliação da Contaminação de As e Cd em Peixes por MIP OES Através da Coprecipitação*

#### **2.1. INTRODUÇÃO**

Os peixes são fontes valiosas de nutrientes e micronutrientes e desempenham um papel importante na nutrição humana [4,88,138]. Além de ser uma fonte rica em proteínas e aminoácidos essenciais, os peixes são uma fonte alimentar de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3, minerais essenciais (cálcio, fósforo, zinco, ferro, selênio e iodo) e vitaminas (A, B e D) [4]. Apesar de conter uma variedade de nutrientes, os peixes também podem apresentar contaminação, a depender do habitat, posição trófica, proximidades de atividade antrópicas e elementos tóxicos, entre outros fatores [139,140]. Por isso a presença de elementos como As, Cd, Hg e Pb, mesmo presentes em quantidades extremamente baixas, apresentam toxicidade elevada ao homem e podem comprometer a qualidade do alimento [100].

O As é um elemento que ocorre naturalmente e tem a sua toxicidade dependente da sua forma química. Em peixes a forma mais abundante é a orgânica arsenobetaína e juntamente com as outras espécies orgânicas, ácido metilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), apresentam baixa toxicidade em relação as espécies inorgânicas As(III) e As(V) [14,66,100]. Por sua vez, o Cd é encontrado muito disperso na natureza. No entanto, há um aumento de sua concentração em determinadas matrizes devido a atividades industriais que o utilizam para os mais diversos fins [100,141]. Os elementos As e Cd não possuem função biológica conhecida e podem ser tóxicos, mesmo em baixas concentrações, e/ou formas químicas apresentando riscos potenciais à saúde humana. Devido aos efeitos mutagênicos e carcinogênico, o As pode afetar os sistemas neurológico,

cardiovascular e respiratório. O Cd por sua vez pode levar a falência renal, afetando também rim e próstata [142–146].

Nos peixes, o Cd normalmente se apresenta em baixas concentrações. A quantidade de As que pode ser encontrado depende do habitat e posição trófica entre outros fatores [4,138]. Nesse contexto, há vários estudos que objetivam o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de As e Cd em peixes. Dentre as técnicas empregadas, a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é a uma das mais almejadas e isto deve-se a sua alta sensibilidade na determinação de elementos traço, no entanto o elevado custo de aquisição limita a sua aplicação [12,55,147].

Uma outra técnica bastante atrativa é o MIP OES. O relativo baixo custo é a sua maior vantagem e deve-se ao uso de nitrogênio ao invés do argônio, um gerador de nitrogênio pode ser empregado ao qual dispensa o uso de cilindro de gases [8]. No entanto, efeitos de matriz e baixa sensibilidade são observados nesta técnica, devido à baixa temperatura do plasma (5000 K) [23,24]. Nesse contexto, diversas estratégias vêm sendo investigadas para minimização dessas limitações como os sistemas alternativos de inserção de amostra como geração de hidretos e vapor frio [28,33,54].

Os métodos de pré-concentração também são excelentes alternativa para minimização dos susceptíveis efeitos de matriz e aumento da sensibilidade por MIP OES. Algumas estratégias de pré-concentração com esse objetivo têm sido empregadas como a extração em fase sólida (SPE) [11], extração em ponto nuvem (CPE) [148], micro-extração dispersiva líquido-líquido (DLLME)[149], coprecipitação [9], entre outras.

A coprecipitação é um interessante método de separação/pré-concentração, ainda pouco explorada por MIP OES, apresenta vantagens como simplicidade, baixo consumo de reagentes e alto fator de pré-concentração, essencial na determinação de elementos traço [41]. Além disso, vários analitos podem ser separados e pré-concentrados em uma única etapa da matriz usando diferentes coprecipitantes, orgânicos ou inorgânicos [150–156]. A coprecipitação envolve a incorporação de traços de analitos de uma fase líquida solúvel no precipitado. A

capacidade dos precipitados de capturar quantidades em baixas concentrações pode ser usada para concentrar elementos traço. Os mecanismos de coprecipitação incluem adsorção de superfície, troca iônica, precipitação de superfície e oclusão [157].

Alguns poucos trabalhos que exploram a coprecipitação para a separação/pré-concentração de elementos traço em amostras de pescado são descritos e destes somente um emprega o MIP OES na determinação. Nesse contexto, Moreia et al. utilizaram  $Mg(OH)_2$  para pré-concentrar por coprecipitação  $As^{5+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{7+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $V^{5+}$  por MIP OES [9]. Já Aydin e colaboradores aplicaram o complexo Cu-2-mercaptopbenzotiazol como carreador para separação de  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  por GFAAS [158]. Um método sem carreador foi estudado empregando N-Benzol-N,N-diisobutiltiourea na coprecipitação e especiação de Sn por GFAAS [159]. Um método para especiação de Cr(III)/Cr(VI) utilizando  $Ni^{2+}$ /ácido 2-Nitroso-1-naftol-4-sulfônico foi avaliado por Soyak et al. [160]. Em outro trabalho foi empregado  $Zr(OH)_4$  para coprecipitação de Pb, Co, Cu, Cd, Fe, e Ni por FAAS [154]. O agente coprecipitante Mn(II)-Br-PADAP foi estudado para pré-concentração de Cd por FAAS [156]. Os parâmetros analíticos desses trabalhos estão descritos na Tabela 2.9

O composto, cromato de prata ( $Ag_2CrO_4$ ), é praticamente insolúvel em água dado a sua constante de solubilidade e apresenta um equilíbrio interessante com a sua espécie dicromato, que por sua vez é solúvel. Este é um composto comum em química analítica, aplicado como indicador em titulação argentométrica pelo método de Mohr [161]. O mecanismo de coprecipitação envolvido na formação do precipitado cromato de prata é o fenômeno de adsorção superficial, caracterizado por um precipitado carregado negativamente seguido da camada de adsorção primária e contrabalanceado pela camada de adsorção secundária, onde os analitos são retidos nas camadas, a depender da sua característica química (Figura 2.1). Este precipitado foi descrito para a coprecipitação de cobre em água por FAAS [41]. É importante enfatizar que poucos trabalhos foram encontrados utilizando o MIP OES e a coprecipitação como preparo de amostra na determinação de analitos, sendo que não temos conhecimento de algum trabalho que utilize cromato de potássio como

carreador aliado a esta técnica. Além disso, o método está alinhado aos princípios da química verde quanto a utilização de baixíssimas quantidades de reagente e a baixa geração de resíduo.

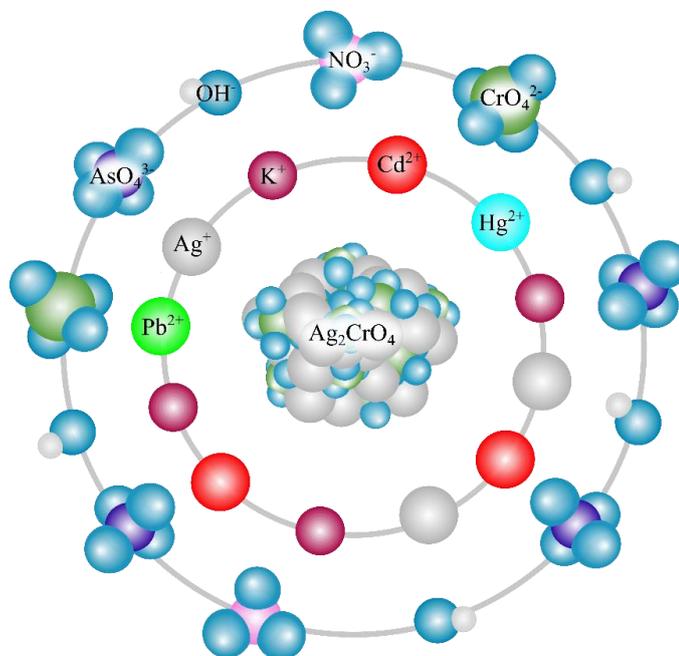


Figura 2.1 Esquema de adsorção superficial no precipitado de cromato de prata

## 2.2 OBJETIVO

Este capítulo tem como objetivo estabelecer as melhores condições da coprecipitação de As e Cd usando o íon cromato e usar planejamento Box-Behnken no desenvolvimento de um método para determinação de traços desses elementos a partir da combinação da coprecipitação e o MIP OES.

## 2.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.3.1 Equipamentos

As determinações de As e Cd foram realizadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas MIP OES (4200 MP-AES, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) equipado com um gerador N<sub>2</sub> (Agilent

Technologies, modelo 4107) e uma bomba peristáltica de cinco canais. Na Tabela 2.1 são apresentadas as condições operacionais instrumentais selecionadas para a determinação dos analitos.

**Tabela 2.1 Parâmetros instrumentais empregados na determinação de As e Cd por MIP OES**

Parâmetros Instrumentais	Condições operacionais	
	As	Cd
Frequência do micro-ondas (MHz)	2450	
Potência do plasma (kW)	1	
Tempo de estabilização (s)	10	
Correção do sinal de fundo	Automática	
Tempo de integração (s)	8	
Nebulizador	OneNeb	
Câmara de nebulização	Ciclônica, duplo-passo	
Posição de observação do plasma	0	
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,75	0,3
Comprimento de onda (nm)	193,695 (I)	228,802 (I)

(I) Linha atômica

Para fins comparativos realizou-se a determinação de As e Cd por ICP-MS (Modelo 7800, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) equipado com uma célula de reação e colisão pressurizada com He de alta pureza (99,9999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil). Argônio de alta pureza (99,999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado para geração do plasma, nebulização e gás auxiliar. Na Tabela 2.2 são apresentados todos os parâmetros operacionais instrumentais e isótopos monitorados. As amostras de peixe foram liofilizadas (Modelo EC, MicroModulyo, Nova York, NY), moídas criogenicamente (MA775, Marconi, Piracicaba, Brasil). A digestão das amostras, assistida por radiação micro-ondas foi realizada em forno de micro-ondas (Milestone, Ethos 1, Sorisole, Itália). As medidas dos pH foram realizadas em pHmetro (Bel Instrument, modelo W3b) e centrífuga (FANEM, Excelsa II 206 BL, São Paulo) foi utilizada para acelerar o processo de decantação do precipitado.

**Tabela 2.2 Parâmetros instrumentais empregados na determinação de As e Cd por ICP-MS**

Parâmetros Instrumentais	Condições de operação
Potência do plasma (W)	1550
Profundidade de amostragem (mm)	10
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Vazão de gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,42
Velocidade de nebulização (rps)	0,1
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de integração (s)	0,3
Vazão do gás de diluição (L min <sup>-1</sup> )	0,6
Vazão do He na célula de reação (mL min <sup>-1</sup> )	4,5
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott, duplo-passo
Isótopos	<sup>75</sup> As, <sup>111</sup> Cd

### 2.3.2 Amostras, soluções e reagentes

Para o desenvolvimento deste estudo, dez amostras de peixes, arraia (*Dasyatis Guttatus*), atum (*Thunus spp.*), bagre (*Bagre spp.*), corvina (*Argyrosomus regius*), dourado (*Salminus brasiliensis*), guaiuba (*Ocyurus chrysurus*), pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), pescada branca (*Cynoscion leiarchus*), sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e vermelho (*Lutjanus analis*) foram analisadas. As amostras foram fornecidas pelo pesquisador Carlos Alberto da Silva da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Essas amostras foram escolhidas devido a frequência de compra da população em geral, de acordo com o boletim estatístico de pesca e aquicultura [162].

As amostras das 10 espécies de peixes foram adquiridas aleatoriamente em feiras livres, peixarias, feiras livres e/ou supermercados, totalizando 30 amostras, sendo 3 amostras por espécie. As amostras de peixes foram refrigeradas e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE. Aproximadamente 100-150 g do músculo látero-dorsal de cada peixe foram separados e liofilizados por 48 h, até atingirem pesos constantes. Em seguida, foram armazenados em freezer a -15 °C. As amostras foram moídas em

processador e peneiradas em malha de nylon de 250  $\mu\text{m}$  para obter amostras homogêneas. Entre cada moagem, o processador foi lavado com solução de ácido nítrico a 10% v/v e depois com água Milli-Q para evitar contaminação cruzada entre as amostras.

Toda vidraria foi mantida em  $\text{HNO}_3$  10% v v<sup>-1</sup> por pelo menos 24 h e lavadas com água ultrapura antes do uso. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada e purificada (resistividade 18.2 M $\Omega$  cm, Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA). Os experimentos foram realizados usando  $\text{HNO}_3$  (Synth, Diadema, SP, Brasil) purificado em um sistema de destilação sub-boiling Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha).

Os materiais de referência certificado de fígado de peixe DOLT-5 (Dogfish Liver - National Research Council Canada) e hepatopancreas de lagosta TORT-3 (Lobster Hepatopancreas - National Research Council Canada) foram utilizados para avaliar o método de coprecipitação e determinação por MIP OES.

Os seguintes reagentes também foram utilizados nesse trabalho: Nitrato de prata (Vetec), Cromato de potássio (Vetec), Acetona (Merck), Hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) e Tris hidroximetil amino metano (Biosolve). As soluções padrão foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de As e Cd (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça).

### ***2.3.3 Digestão das amostras***

Para digestão das amostras, 200 mg de cada amostra foi pesado diretamente nos frascos de digestão (PFA). Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão assistida por radiação micro-ondas em equipamento ETHOS 1 (Milestone, Sorisole, Itália) em triplicata, usando 8,0 mL de  $\text{HNO}_3$  (4,2 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% m v<sup>-1</sup>). O programa de aquecimento aplicado foi: (1) 15 min em 120 °C, (2) 20 min até alcançar 180°C e (3) 20 min em 180°C. A temperatura foi controlada por um sensor infravermelho instalado em um dos frascos de digestão. Subsequentemente, os digeridos foram diluídos até 20,0 mL com água ultrapura e submetido ao procedimento de coprecipitação.

### 2.3.4 Método de coprecipitação

Todo o método de coprecipitação foi otimizado usando-se soluções padrão. Em tubos contendo 20 mL de amostra foram adicionados 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As e Cd, o pH ajustado a 7,0 com auxílio da solução tampão Tris 0,1 mol L<sup>-1</sup> e adicionado 5,46 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de cromato e 1,16 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de prata. O tubo foi agitado manualmente por alguns segundos e em seguida foi centrifugado em 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado permaneceu aderido ao tubo e este foi solubilizado com 0,7 mL de HNO<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Os analitos foram determinados por espectrometria óptica de emissão com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).

### 2.3.5 Estratégia de otimização

Para a otimização do procedimento de coprecipitação foi empregado um planejamento Box-Behnken, aos quais foram avaliados os parâmetros críticos para a extração. Os níveis estudados foram adaptados a partir de trabalho já descrito na literatura e experimentos preliminares. O planejamento Box-Behnken foi empregado para a otimização do procedimento de coprecipitação e os fatores e níveis encontram-se na Tabela 2.3. Para análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICA 12, tendo nível de confiança fixo em 95%.

**Tabela 2.3** Fatores e níveis estudados no planejamento Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] mol L <sup>-1</sup>	3,64x10 <sup>-4</sup>	5,46 x10 <sup>-4</sup>	7,29 x10 <sup>-4</sup>
[Ag <sup>+</sup> ] mol L <sup>-1</sup>	0,775x10 <sup>-3</sup>	1,16 x10 <sup>-3</sup>	1,55 x10 <sup>-3</sup>
Acetona (μL)	0	250	500

Os resultados foram tratados em relação a resposta múltipla (RM), conforme Equação 2.1, onde o As é a intensidade obtida para este analito em cada experimento e o IAs é a maior intensidade obtida para o analito As no bloco de experimento estudado, da mesma forma foi realizado para os demais analitos. Resumidamente, representa a soma das resposta de cada analito normalizada.

$$RM = \frac{As}{I_{As}} + \frac{Cd}{I_{Cd}} \quad \text{Equação 2.1}$$

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 *Otimização das condições de coprecipitação*

A aplicação de ferramentas quimiométricas no desenvolvimento de métodos analíticos é de grande importância, pois permite extrair o máximo de informação química mediante a análise de dados com intuito de obter conhecimento sobre o procedimento estudado [163]. A otimização multivariada é interessante no estabelecimento de métodos de pré-concentração por fornecer análise das interações dos fatores envolvidos [9,149]. Nesse contexto, as condições experimentais foram realizadas explorando as vantagens da otimização multivariada, com o intuito de possibilitar a extração da maior quantidade possível dos elementos, obtendo-se maior eficiência na extração e maior sensibilidade na determinação.

Um planejamento Box-Behnken contendo 15 experimentos foi utilizado para estudar as condições de extração dos analitos. Os fatores  $[\text{CrO}_4^{2-}]$ ,  $[\text{Ag}^+]$  e solvente orgânico [acetona] foram estudados. A Tabela 2.4 mostra o planejamento experimental Box-Behnken aplicado, valores reais, valores codificados e a resposta analítica representada pela resposta múltipla.

**Tabela 2.4 Planejamento Box-Behnken com os valores codificados e reais para otimização da coprecipitação de As, Cd e determinação por MIP OES**

Experimento	[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] $\times 10^{-4}$	[Ag <sup>+</sup> ] $\times 10^{-3}$	Acetona ( $\mu\text{L}$ )	Resposta múltipla
1	3,64 (-1)	0,775 (-1)	250 (0)	1,33
2	3,64 (-1)	1,55 (1)	250 (0)	1,11
3	7,29 (1)	0,775 (-1)	250 (0)	1,13
4	7,29 (1)	1,55 (1)	250 (0)	1,73
5	3,64 (-1)	1,16 (0)	0 (-1)	1,98
6	3,64 (-1)	1,16 (0)	500 (1)	1,22
7	7,29 (1)	1,16 (0)	0 (-1)	1,56
8	7,29 (1)	1,16 (0)	500 (1)	1,41
9	5,46 (0)	0,775 (-1)	0 (-1)	1,98
10	5,46 (0)	0,775 (-1)	500 (1)	1,53
11	5,46 (0)	1,55 (1)	0 (-1)	1,81
12	5,46 (0)	1,55 (1)	500 (1)	1,42
13	5,46 (0)	1,16 (0)	250 (0)	1,73
14	5,46 (0)	1,16 (0)	250 (0)	1,98
15	5,46 (0)	1,16 (0)	250 (0)	1,94

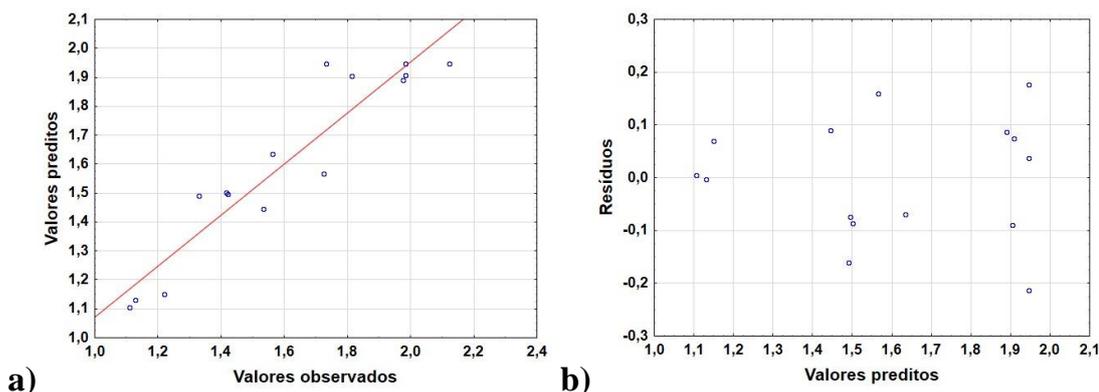
O modelo matemático estatístico foi validado a partir da Análise de Variância (ANOVA) com teste da falta de ajuste, gráfico dos valores preditos *versus* valores observados e gráfico de resíduos *versus* valores preditos. Com ANOVA apresentada na Tabela 2.5, observou-se que a falta de ajuste para o modelo quadrático não foi significativa, pois o valor da razão da  $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$  é (0,88) inferior ao valor de  $F_{\text{tabelado}}$  (19,16) para 3 e 2 graus de liberdade, respectivamente. Assim, o modelo quadrático está bem ajustado aos dados obtidos pois a média quadrática da falta de ajuste ( $MQ_{\text{faj}}$ ) e a média quadrática do erro puro ( $MQ_{\text{ep}}$ ) são estimativas desses erros e presume-se que estes dois valores não são estatisticamente diferentes e a razão deles foi inferior ao valor de F tabelado.

**Tabela 2.5 ANOVA usando a RM com um nível de confiança de 95 %**

Fatores	SQ	Gl	MQ	F	p
[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] (L)	0,0051	1	0,0051	0,131	0,7520
[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] (Q)	0,5440	1	0,5440	13,939	0,0648
[Ag <sup>+</sup> ] (L)	0,0011	1	0,0011	0,030	0,8782
[Ag <sup>+</sup> ] (Q)	0,2115	1	0,2115	5,419	0,1453
Acetona (L)	0,3795	1	0,3795	9,724	0,0892
Acetona (Q)	0,0013	1	0,0013	0,035	0,8679
[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] <i>versus</i> [Ag <sup>+</sup> ]	0,1683	1	0,1683	4,314	0,1734
[CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] <i>versus</i> Acetona	0,0920	1	0,0920	2,357	0,2644
[Ag <sup>+</sup> ] <i>versus</i> Acetona	0,0007	1	0,0007	0,019	0,9012
Falta de ajuste	0,1037	3	0,0345	0,885	0,5689
Erro puro	0,0780	2	0,0390		
Soma quadrática	1,5390	14			

SQ -Soma quadrática; gl-Graus de liberdade; MQ-Média Quadrática

A análise do gráfico dos valores preditos *versus* valores observados, apresentado na Figura 2.2(a), demonstra a concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais ( $R^2 = 0,88$ ) confirma que o modelo quadrático está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no procedimento, com percentagem de variação explicada em torno de 88%, apresentando menores resíduos e desta forma boa capacidade de previsão. Assim como a falta de ajuste, avaliar os resíduos deixados pelo modelo é importante, e para um modelo bem ajustado os resíduos não podem apresentar indícios de anormalidade. A Figura 2.2(b) apresenta o gráfico de resíduos e pode-se observar que os valores dos resíduos se apresentam na ordem de magnitude na faixa de  $\pm 0,2\%$  e se distribuem aleatoriamente, mostrando mais uma vez que o modelo quadrático está bem ajustado.



**Figura 2.2 a) Gráfico de valores preditos *versus* valores observados e b) gráfico de resíduos *versus* valores preditos para o modelo quadrático usando a resposta múltipla**

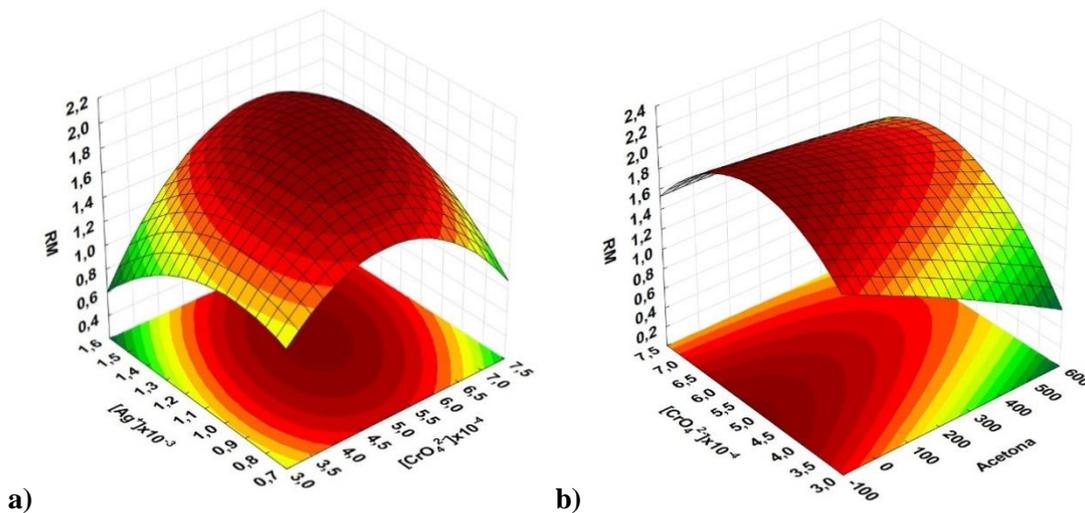
O modelo matemático desenvolvido a partir dos dados experimentais empregando o planejamento Box-Behnken foi utilizado para determinação das melhores condições de extração dos analitos pela coprecipitação. Nesse sentido, a resposta múltipla foi selecionada como resposta e um modelo matemático de segunda ordem foi obtido e é descrito na Equação 2.2. As coordenadas de ponto crítico estabelecem as melhores respostas para os fatores estudados. A aplicação do critério de Lagrange revelou que o ponto ótimo é classificado como um ponto de máximo. As coordenadas do ponto de máximo (condições ótimas) foram encontradas obtendo-se as primeiras derivadas em relação às variáveis e igualando-as a zero gerando um sistema de equações do primeiro grau. Resolvenso-se este sistema, encontram-se as condições ótimas. Através desses cálculos, determinou-se os valores críticos para cada fator estudado sendo:  $[\text{CrO}_4^{2-}] = 5,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Ag}^+] = 1,16 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e 0  $\mu\text{L}$  acetona.

$$\begin{aligned} \text{Resposta Múltipla} = & 1,94 \pm 0,11 + 0,025 \pm 0,070 [\text{CrO}_4^{2-}] (\text{L}) - 0,38 \pm 0,10 [\text{CrO}_4^{2-}] (\text{Q}) + \\ & 0,012 \pm 0,070 [\text{Ag}^+] (\text{L}) - 0,24 \pm 0,10 [\text{Ag}^+] (\text{Q}) - 0,218 \pm 0,070 \text{ Acetona} (\text{L}) - 0,02 \pm 0,10 \\ & \text{Acetona} (\text{Q}) + 0,20 \pm 0,10 [\text{CrO}_4^{2-}] \textit{ versus } [\text{Ag}^+] 0,15 \pm 0,10 [\text{CrO}_4^{2-}] \textit{ versus } \text{Acetona} \\ & 0,013 \pm 0,10 [\text{Ag}^+] \textit{ versus } \text{Acetona} \end{aligned} \quad \text{Equação 2.2}$$

A análise das superfícies de resposta é uma forma adicional e visual de se extrair informações quanto as melhores condições de extração dos analitos por coprecipitação. Nas superfícies de resposta dois fatores são plotados em relação a resposta múltipla, indicando a região de máxima e mínima resposta obtidas dentro do

domínio experimental, e a região em vermelho mais intenso indica o valor correspondente a esta maior eficiência de extração. Na Figura 2.3 estão apresentadas as superfícies de resposta obtidas para o planejamento Box-Behnken trabalhado.

Sá e colaboradores [41] avaliaram a dependência do pH nesse sistema de coprecipitação utilizando o cromato como agente carreador de cobre em água. Neste contexto, o mesmo pH 7,0 foi adotado para a coprecipitação de As e Cd em peixes. No entanto, por se tratar de uma matriz diferente a analisada, as concentrações dos reagentes responsáveis pela formação do precipitado foram estudadas. A adição de solvente orgânico (acetona) também foi avaliada, pois a diminuição da constante dielétrica do solvente pode levar a uma diminuição da solubilidade ou diminuição do valor da constante do produto de solubilidade condicional, favorecendo a formação de mais precipitado e conseqüentemente maior extração dos analitos [164]. No entanto, este efeito não foi observado para esse sistema de coprecipitação, no domínio experimental estudado. Assim, as condições críticas obtidas pelos cálculos  $[\text{CrO}_4^{2-}] = 5,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Ag}^+] = 1,16 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e a não utilização de acetona, corroboram com a análise dos pontos máximos de resposta, estando todos os valores críticos dentro do domínio experimental estudado.



**Figura 2.3 Superfícies de resposta obtidas a partir planejamento Box-Behnken para as variáveis**

## 2.4.2 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos do método proposto, como faixa linear, fator de enriquecimento, curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação e precisão são apresentados na Tabela 2.6. O fator de enriquecimento experimental foi calculado utilizando a relação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem pré-concentração. De forma complementar, os demais parâmetros foram calculados conforme recomendado pela IUPAC [130]. Nesse contexto, o desvio padrão de dez réplicas autênticas do branco foram utilizados. O limite de detecção (LOD) definido como três vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente de angular da curva. O limite de quantificação (LOQ) definido como dez vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente de angular da curva. A precisão do procedimento foi avaliada como desvio padrão relativo (% RSD) de 10 determinações distintas nas concentrações  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  e estes valores não foram maiores que 8,8 % para o As e 3,5 % para o Cd.

**Tabela 2.6** Resumo dos parâmetros analíticos desenvolvidos para o método de coprecipitação de As e Cd por MIP OES

Parâmetro	Analito	
	As	Cd
Curva calibração	Intensidade = $6,49 [\mu\text{g L}^{-1}] + 33,7$	Intensidade = $40,56 [\mu\text{g L}^{-1}] + 34,1$
LOD	$0,39 \mu\text{g g}^{-1}$	$0,010 \mu\text{g g}^{-1}$
LOQ	$1,3 \mu\text{g g}^{-1}$	$0,034 \mu\text{g g}^{-1}$
Faixa de trabalho	$1,3 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,034 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$
Fator de enriquecimento	26	11
Precisão	8,8 %	3,5 %

Na literatura são descritos alguns trabalhos para determinação de elementos em peixes empregando a coprecipitação (Tabela 2.9). O fator de enriquecimento obtido neste trabalho foi comparável com os encontrados em estudos que empregam técnicas com sensibilidade parecida, como é o caso da FAAS. No entanto, estes trabalhos empregam altos volumes de amostra (100 a 500 mL) e volume final (2 a 5 mL), o que afeta diretamente na sensibilidade do método. Uma forma de contornar essa limitação

seria solubilizar o precipitado em um volume menor, após a aplicação da coprecipitação.

### 2.4.3 Veracidade e aplicação

A veracidade do método proposto foi avaliada pela análise de dois materiais de referência certificados, fígado de peixe (DOLT-5) e hepatopancreas de lagosta (TORT-3), obtendo-se valores de recuperação variando de 91% a 101% para As e 88% a 93% para Cd respectivamente, com o emprego do método de coprecipitação desenvolvido e determinado por MIP OES. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2.7. A avaliação estatística, por meio do teste t de Student, mostrou que não há diferença significativa entre os valores obtidos e o valores certificados com nível de confiança de 95%, confirmando a veracidade do método.

**Tabela 2.7 Avaliação da veracidade do método coprecipitação-MIP OES e ICP-MS nos CRMs (DOLT-5) e (TORT-3), resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão (n =3)**

CRM	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Coprecipitação-MIP OES		ICP-MS	
	As	Cd	As	Cd
DOLT-5 <sup>a</sup>	31,56 $\pm$ 2,21	13,11 $\pm$ 0,32	32,14 $\pm$ 2,81	12,79 $\pm$ 0,92
TORT-3 <sup>b</sup>	55,43 $\pm$ 3,04	38,69 $\pm$ 1,59	54,83 $\pm$ 1,62	39,54 $\pm$ 2,13

a: valor certificado DOLT-5 = 34,6  $\pm$  2,4 (As) e 14,5  $\pm$  0,6 (Cd);

b: valor certificado TORT-3 = 54,9  $\pm$  2,5 (As) e 42,3  $\pm$  1,8 (Cd).

O método proposto foi aplicado na coprecipitação e separação/pré-concentração dos analitos por MIP OES nas amostras de peixes e os resultados foram comparados com os valores obtidos por ICP-MS para uma avaliação complementar do método (Tabela 2.8). A avaliação estatística por meio do teste t pareado com nível de confiança de 95% não demonstrou diferença estatística entre os valores obtidos pelo método de coprecipitação MIP OES e os obtidos pela análise direta no ICP-MS, considerando que o valor de t calculado é 1,80 (As) e 0,95 (Cd), enquanto o valor de t-crítico foi 2,26.

**Tabela 2.8** Aplicação do método separação e pré-concentração desenvolvido para determinação de As e Cd em amostras de peixes (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)

Amostra	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Coprecipitação-MIP OES		ICP-MS	
	As	Cd	As	Cd
Corvina	11,54 $\pm$ 0,15	0,0115 $\pm$ 0,0016	12,14 $\pm$ 0,08	0,0135 $\pm$ 0,0006
Atum	4,56 $\pm$ 0,38	0,0308 $\pm$ 0,0020	4,828 $\pm$ 0,062	0,0328 $\pm$ 0,0017
Vermelho	3,54 $\pm$ 0,21	0,0914 $\pm$ 0,0077	3,378 $\pm$ 0,004	0,0894 $\pm$ 0,0057
Bagre	2,57 $\pm$ 0,19	0,0267 $\pm$ 0,0010	2,357 $\pm$ 0,026	0,0259 $\pm$ 0,0018
Dourado	5,91 $\pm$ 0,53	0,0337 $\pm$ 0,0015	6,313 $\pm$ 0,191	0,0343 $\pm$ 0,0008
Guaiuba	3,23 $\pm$ 0,16	< 0,010	3,445 $\pm$ 0,023	0,0056 $\pm$ 0,0002
Arraia	26,38 $\pm$ 1,02	0,0192 $\pm$ 0,0012	26,08 $\pm$ 0,56	0,0212 $\pm$ 0,0022
Sardinha	54,73 $\pm$ 2,51	0,0269 $\pm$ 0,0017	56,69 $\pm$ 0,33	0,0249 $\pm$ 0,0013
Pescada branca	8,06 $\pm$ 0,72	0,0148 $\pm$ 0,0012	8,658 $\pm$ 0,013	0,0168 $\pm$ 0,0021
Pescada amarela	< 0,39	0,0297 $\pm$ 0,0023	0,301 $\pm$ 0,008	0,0277 $\pm$ 0,0029

Os teores encontrados nas amostras analisadas foram entre 2,57 e 54,7 (As) e entre 0,011 e 0,091 (Cd). A variação da fração de massa de As entre as amostras pode ser explicada devido a cotaminação, a depender do habitat e posição trófica. Dentre as amostras analisadas a sardinha, arraia e corvina apresentaram os valores mais elevados de As. Já o vermelho, atum, e dourado apresentaram os maiores teores de Cd. De acordo com os resultados todas as amostras de peixe estão acima do limite máximo permitido para As, 1,0 mg kg<sup>-1</sup> As (ANVISA), já amostra de vermelho (0,091 mg kg<sup>-1</sup>) encontra-se própria para consumo humano de acordo com a legislação brasileira (0,1 mg kg<sup>-1</sup>) [7], mas imprópria de acordo com a EU (0,05 µg g<sup>-1</sup> Cd).

Para essas amostras, ainda é de interesse no âmbito da segurança do alimento realizar a especiação de As para verificar a quantidade de espécies inorgânicas. A análise de especiação química pode nos fornecer uma real situação da contaminação dos peixes, visto que as espécies orgânicas do As expressam menor toxicidade em relação as suas espécies inorgânicas.

**Tabela 2.9 Comparação do método proposto com alguns estudos de coprecipitação em amostras de peixes**

Agente carreador	Analitos	LOD	FE	Técnica	Ref.
Hidróxido de magnésio	As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni, V	0,01–0,33 <sup>b</sup>	5-25	MIP OES	[9]
Hidróxido de zircônio	Pb, Co, Cu, Cd, Fe, Ni	0,27–2,50 <sup>a</sup>	25	FAAS	[154]
Mn(II)-Br-PADAP	Cd	4,27 <sup>a</sup>	-	FAAS	[156]
Cu-2-mercaptopentotiazol	Cd e Pb	1,38 <sup>c</sup> , 0,02 <sup>c</sup>	17,5-7	GFAAS	[158]
N-Benzol-N,N-diisobutiltioureia	Sn (II)	0,013 <sup>a</sup>	50	GFAAS	[159]
Ni <sup>2+</sup> /ácido 2-Nitroso-1-naftol-4-sulfônico	Cr(III)	1,33 <sup>a</sup>	50	FAAS	[160]
Cromato de prata	As, Cd	0,39 <sup>b</sup> , 0,010 <sup>b</sup>	25,6 - 11,2	MIP OES	Este trabalho

FE: Fator de enriquecimento; LOD: Limite de detecção; a:  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; b:  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; c:  $\text{ng g}^{-1}$

## 2.5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Um método foi desenvolvido para separação/pré-concentração baseado na coprecipitação de As e Cd aplicado em amostras de peixes e determinação por MIP OES. O emprego da coprecipitação foi uma estratégia eficiente para aumentar a sensibilidade do MIP OES. Desta forma, foi possível a determinação de arsênio e cádmio em peixes. A utilização do planejamento Box-Behnken se mostrou adequada para a otimização das condições de extração de As e Cd nas amostras.

A combinação da coprecipitação com a determinação por MIP OES forneceu um método com exatidão satisfatória e sensibilidade adequada para essa finalidade. A veracidade foi avaliada com o emprego de CRMs e em comparação com ICP-MS. Os limites de determinação obtidos se mostraram adequados para atender aos limites estabelecidos pela legislação.

As principais vantagens do método desenvolvido foram a sua simplicidade, baixo custo e bons parâmetros analíticos. Estes resultados indicam a viabilidade de aplicação deste método de coprecipitação na separação/pré-concentração de As e Cd e determinação por MIP OES. No entanto, uma análise de especiação química ainda é requerida para avaliar a real toxicidade de As nos peixes.

## Capítulo 3

### *Desenvolvimento de Método para Especificação Química de As em frutos do mar e Cr em amostras agrícolas por LC-ICP-MS*

#### 3.1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) e o cromo (Cr) são elementos tóxicos e têm alta prioridade na lista da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) [165]. Esses elementos também são reconhecidos pela Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer (IARC) como cancerígenos humanos [166]. O As e o Cr ocorrem naturalmente em uma variedade de espécies químicas, com diferentes níveis de toxicidade. Dentre as espécies mais comuns para o As, as espécies orgânicas, arsenobetaína (AsB), monometilarsênio (MMA) e dimetilarsênio (DMA) são as menos tóxicas e as espécies inorgânicas arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)] são consideradas extremamente tóxicas aos humanos. Já o Cr(III) é considerado essencial ao metabolismo da glicose, enquanto o Cr(VI) é carcinogênico [167]. Autoridade europeia de segurança alimentar (EFSA) aponta controvérsia quanto a ingestão de Cr(III) pois segundo diferentes estudos recentes não foram encontradas evidências de efeitos benéficos associados à ingestão de cromo em indivíduos saudáveis [92].

Para a população em geral a maior fonte de exposição ao As e Cr é por via alimentar. Nesse contexto, produtos de origem animal, como os frutos do mar são reconhecidos por representar importante fonte de proteína e por serem ricos em minerais. O seu consumo é associado aos benefícios da saúde, pois auxiliam no desenvolvimento neurológico e na prevenção de doenças cardíacas [65,105,168–170]. Apesar da notável vantagem para a nutrição humana, os frutos do mar podem absorver e metabolizar altas concentrações de elementos tóxicos, como o arsênio e o cromo, em seus tecidos, representando riscos à saúde humana. Essa contaminação é proveniente de diversos fatores, como atividade antrópica. Como exemplo, a

utilização de pesticida arseniato de metila monossódico ou resíduos de cromo na indústria de curtimento de couros, entre outros [69,89,171].

Devido aos diferentes níveis de toxicidade das espécies de arsênio e cromo encontrados nos pescados e às inúmeras formas de contaminação alimentar, a análise de especiação química de As e Cr é cada mais que necessária quando o assunto é segurança alimentar. Desta forma, vários países têm estabelecido limites para estes analitos no consumo seguro de frutos do mar. No entanto, para o As os órgãos reguladores tem relutado em estabelecer um limite máximo e isto deve-se a diversidade de formas moleculares que podem ser encontradas em fruto do mar [89,172]. No Brasil, o limite máximo estabelecido em pescados é definido para o teor total de As, 1,0 mg/kg, mas para o Cr ainda não existe legislação vigente no país que estabeleça estes limites [173]. Porém, é reconhecido que o limite máximo estabelecido para As total não é suficiente, visto que a AsB é a espécie predominante em pescados [174]. Em outras países, as agências governamentais têm estabelecido limites considerando somente a concentração das espécies inorgânicas de As em pescado, sendo que os limites variam de acordo com país e o tipo de pescado [175–177]. Limites para arsênio inorgânico foram estabelecidos em diversos tipos de arroz pela União Europeia. Na legislação brasileira atualmente em vigor também foram estabelecidos limites máximos para As inorgânico para alimentos infantis e parturientes, sendo que esta será uma tendência para outros tipos de alimentos, como os pescados [7, 69,175,178].

A escolha do método de extração é um dos mais importantes passos durante a análise de especiação química de As e Cr em amostras de pescado [13,65,71,89,174,175,179–181]. No entanto, é importante mencionar que a especiação química destes analitos em matrizes sólidas é um desafio, pois a integridade das espécies deve ser mantida em todas as etapas da análise [182–184]. A estabilidade das espécies de As e Cr após preparo da amostra deve ser assegurada para evitar que os resultados sejam subestimados ou superestimados.

Diferentes métodos têm sido propostos para o preparo de amostra visando a especiação de As em pescado, sendo que os mais comuns usam soluções de ácido

nítrico diluído, misturas metanol-água, ou só água [65,174,185]. O emprego de ultrassom, micro-ondas e agitação são considerados nesses métodos. De forma geral, os métodos envolvendo a extração por ultrassom podem afetar a integridade das amostras caso os parâmetros de extração não sejam bem ajustados [186]. Já os métodos de extração por micro-ondas com HNO<sub>3</sub> reduzem o tempo de preparo da amostra, podendo aumentar o risco de interconversão das espécies. Apesar dos diferentes tipos de solução de extração e fontes de aquecimento terem sido avaliadas para especiação de As em pescados, o estabelecimento de um único método para análise de especiação não é trivial e a avaliação para cada tipo de pescado é necessária. Além do mais, a exatidão de alguns métodos encontrados na literatura não apresentou o rigor esperados dos métodos analíticos, levando a resultados equivocados [182,187].

Para o Cr foram encontrados diversos métodos para extração das suas espécies em amostras de alimentos, no entanto nenhum específico para amostras de pescado [71]. Ao contrário do observado para outros tipos de matriz, a mistura NaOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> é pouco explorada na extração de cromo em alimentos. Geralmente são empregados variados sais alcalinos para extração efetiva do Cr(VI) nas amostras alimentícias. Métodos de extração empregando ultrassom, micro-ondas, agitação e chapa aquecedora são empregados [67,68,180,188–190]. A extração com EDTA em pH alcalino para estabilizar as espécies de Cr (Cr(VI) através do pH alcalino e Cr(III) através da complexação com EDTA) tem sido investigado [179,191].

Em relação a separação e detecção das espécies, a combinação de técnicas analíticas é usualmente necessária para alcançar a seletividade e a sensibilidade adequadas para a análise de especiação química. A cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS) é a combinação mais adequada para especiação de As em pescados e Cr em alimentos [65,67,68,174]. Esse acoplamento fornece uma detecção seletiva das espécies químicas em níveis traço, além de proporcionar ótimas separações das espécies de As e Cr, empregando colunas cromatográficas aniônicas ou catiônicas [192]. A detecção por ICP-MS pode apresentar interferências poliatômica (<sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl) durante a determinação de <sup>75</sup>As e a interferência (<sup>40</sup>Ar<sup>12</sup>C) na determinação de <sup>52</sup>Cr, as quais

ocorrem em matrizes contendo alta concentração de cloreto, como os pescados de água salgada. O He é um dos gases que podem ser utilizados na cela de reação para redução dessas interferências poliatômicas mencionadas [192].

## **3.2 OBJETIVO**

O objetivo desse capítulo é explorar a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS) no desenvolvimento de métodos para especiação de As em frutos do mar e Cr para amostras agrícolas. Avaliar a matriz Doehlert para otimizar as condições de extração das espécies As(V), As(III), AsB, MMA e DMA nas amostras de camarão, peixe e molusco bivalve e o planejamento Box-Behnken para otimizar as condições de extração das espécies Cr(III) e Cr(VI) em camarão, peixe, molusco bivalve e solo.

## **3.3 PARTE EXPERIMENTAL**

### ***3.3.1 Equipamentos***

As análises de especiação foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida (1260 series Infinity II, Agilent Technologies, Japão), com bomba quaternária (G7111A, Agilent Technologies) e um auto amostrador (G129A, Agilent Technologies) com 100 posições para frascos de 2 mL. As colunas de troca aniônica foram utilizadas para separação das espécies de arsênio (G3288-80000, 4,6 mm x 150 mm, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão). Para as espécies de Cr (G3268-80001, 4,6 mm x 30mm, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão), coluna de guarda (G3154-65002, 4,6 mm x 10 mm, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) e kit de conexão LC (G1833-65200, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) foram utilizadas. A eluição foi realizada em modo isocrático e o fluxo da fase móvel foi mantida em 1,0 mL min<sup>-1</sup> (As) e 0,7 mL min<sup>-1</sup> (Cr). O sistema foi acoplado ao ICP-MS através de um capilar PEEK da saída da coluna do HPLC ao nebulizador concêntrico do sistema de introdução do ICP-MS. O método de configuração integrado e controle sequencial do sistema combinado

LC-ICP-MS foi realizado a partir do software ICP-MS MassHunter (MH) (Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão).

Para determinação de As e Cr, um espectrômetro de massas acoplado indutivamente (ICP-MS 7800, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) equipado com uma célula de reação e colisão pressurizada com He de alta pureza (99,9999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil). Argônio de alta pureza (99,999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado para geração do plasma, nebulização e gás auxiliar. Os parâmetros instrumentais operacionais são apresentados na Tabela 3.1. As amostras de frutos do mar foram liofilizadas (Modelo EC, MicroModulyo, Nova York, NY), moídas criogenicamente (MA775, Marconi, Piracicaba, Brasil) e digeridas em meio ácido em forno de micro-ondas (Multiwave Go Plus, Anton Paar, Graz, Austria). As medidas dos valores de pH foram realizadas em pHmetro (Bel Instrument, modelo W3b) e as extrações das espécies de As e Cr para análise de especiação foram realizadas em bloco digestor (MA4025, Marconi, Piracicaba, Brasil). A dispersão da solução extratora nas amostras foi feita com vortex (Marconi, Piracicaba, Brasil). Uma centrífuga com capacidade para tubos de 15 e 50 mL (Excelsa II 206 BL, FANEM, São Paulo, Brasil) foi empregada para aceleração da decantação do particulado.

**Tabela 3.1 Parâmetros instrumentais do LC-ICP-MS para análise de especiação química de As e Cr**

<b>Análise de especiação química de As (LC)</b>	
Fase móvel	10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 1% (v v <sup>-1</sup> ) metanol pH 8,0
Vazão da fase móvel	1,0 mL min <sup>-1</sup>
Modo de eluição	Isocrático
Volume injetado	50 µL
Tempo de análise	720 s
Medida	Análise resolvida no tempo (TRA)
<b>Análise de especiação química de Cr (LC)</b>	
Fase móvel	15 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 mM EDTA, 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0
Vazão da fase móvel	0,7 mL min <sup>-1</sup>
Modo de eluição	Isocrático
Volume injetado	50 µL
Tempo de análise	360 s
Medida	Análise resolvida no tempo (TRA)
<b>ICP-MS</b>	
Potência de radio-frequência	1550 W
Profundidade de amostragem	8 mm
Vazão do gás de nebulização	1,1 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás He	4,5 mL min <sup>-1</sup>
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott , duplo passo
Isótopo monitorados	<sup>75</sup> As, <sup>52</sup> Cr

### ***3.3.2 Amostras, soluções e reagentes***

Para o desenvolvimento deste estudo, seis amostras de peixes, arabaiana (*Seriola spp.*), bijupirá (*Rachycentron canadum*), cação (*Carcharhinus plumbeus*), corvina (*Argyrosomus regius*), linguado (*Paralichthys brasiliensis*) e sardinha (*Sardinella brasiliensis*) foram fornecidas pelo pesquisador Carlos Alberto da Silva, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Essas amostras foram escolhidas devido a frequência de consumo da população brasileira, de acordo com o boletim estatístico de pesca e aquicultura [162]. Também foram utilizados o molusco bivalve tarioba (*Iphigenia brasiliensis*), proveniente da zona de estuário da cidade de Ilhéus, BA, camarão cinza (*Litopenaeus Vannamei*) obtido no mercado local de São Carlos, SP e camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) proveniente do município de São Sebastião, SP, bem como suas cabeças, patas e cascas, devido a sua utilização no preparo de diversos pratos culinários.

As amostras das 6 espécies de peixes foram adquiridas aleatoriamente em feiras livres, peixarias, feiras livres e/ou supermercados, totalizando 18 amostras, sendo 3 amostras por espécie. As amostras de peixes foram refrigeradas e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE. Aproximadamente 100-150 g do músculo látero-dorsal de cada peixe foram separados e liofilizados por 48 h, até atingirem pesos constantes. Em seguida, foram armazenados em freezer a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram moídas em processador e peneiradas em malha de nylon de 250  $\mu\text{m}$  para obter amostras homogêneas. Entre cada moagem, o processador foi lavado com solução de ácido nítrico a 10% v/v e depois com água Milli-Q para evitar contaminação cruzada entre as amostras.

Para o desenvolvimento e avaliação da veracidade do método de As e Cr total por ICP-MS e do método de especiação de As e Cr por LC-ICP-MS, quatro materiais de referência certificado, (proteína de peixe (DORM-4, NRC, Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá) e fígado de cação (DOLT-5, NRC), hepatopancreas de lagosta (TORT-3, NIST) tecido de ostra (1566b, NIST), e solo contaminado com cromo hexavalente (2701, NIST), e o material de referência de tecido de peixe desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo-SP) foram usados.

Toda vidraria foi mantida em HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) por pelo menos 24 h e lavadas com água antes do uso. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água com resistividade 18,2 MΩ cm, purificada em sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Os experimentos foram realizados usando HNO<sub>3</sub> (Synth, Diadema, SP, Brasil) purificado em um sistema de destilação sub-boiling Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha).

As soluções de referência para a determinação de As e Cr total (0,1 a 20 µg L<sup>-1</sup>) foram preparadas em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) a partir de uma solução padrão para ICP-MS (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça). A solução de padrão interno (PI) de 500 µg L<sup>-1</sup> de Ga foi preparada em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) a partir de uma solução de PI 1000 mg L<sup>-1</sup> Ga (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça).

Para a análise de especiação de As a fase móvel contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) foi preparada diariamente pela dissolução do sal (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth) em água contendo 1% (v/v) de metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich). O pH da fase móvel foi ajustado com uma solução de NH<sub>3</sub> saturada em água (Synth). Já para o Cr, a fase móvel 15 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Vetec), 5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (Êxodo Científica), 5 mmol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth) (pH 7,0) foi preparada diariamente pela dissolução dos sais em água.

Soluções de calibração de As(III), As(V), AsB, DMA, MMA, Cr(III) e Cr(VI) (0,1 a 20 µg L<sup>-1</sup> como As/Cr) foram preparadas diariamente a partir das soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (como As/Cr) de As(III), As(V), AsB, DMA, MMA, Cr(III) e Cr(VI), que foram previamente preparadas a partir da dissolução dos sais de NaAsO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>AsO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>Na · 3H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), CH<sub>3</sub>AsO(ONa)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Dinâmica), e K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) em água, respectivamente.

### ***3.3.3 Preparo da amostra***

#### ***3.3.3.1 Determinação de As e Cr Total***

Para a digestão das amostras, 200 mg das amostras foram pesadas diretamente nos frascos de digestão do forno micro-ondas, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> (7,0 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m v<sup>-1</sup>). O programa de aquecimento foi de (1) 20 min até 180°C e (2) 20 min em 220°C. Após a digestão, as soluções foram diluídas para 30 mL com água, e a concentração de As e Cr total foi determinada por ICP-MS.

#### ***3.3.3.2 Especificação de As em pescados***

Para extração das espécies de As, 100 mg de amostra de pescado foi pesado diretamente em frasco de digestão PFA com boca rosqueável e tampa de PFA, sendo a seguir adicionados 5 mL de HNO<sub>3</sub> 30 mmol L<sup>-1</sup>. As amostras foram agitadas em vortex por 30 s e levadas ao aquecimento em bloco digestor por 40 min em temperatura de 90°C. Após resfriamento, o extrato foi centrifugado a 3200 rpm por 5 min e 1 mL do sobrenadante foi transferido a outro frasco e diluído 5 vezes com a fase móvel. Por fim, filtrado com filtro de seringa 0,22 µm de PTFE (Analítica) e transferido ao amostrador do LC-ICP-MS para análise de especificação de As.

#### ***3.3.3.3 Especificação de Cr em amostras agrícolas***

Para extração das espécies de Cr, 100 mg de amostra agrícola foi pesada diretamente em frasco de digestão com boca rosqueável e tampa de PFA e adicionado 5 mL de EDTA 45 mmol L<sup>-1</sup> em pH 10,0. As amostras foram agitadas em vortex por 30 s e levadas ao aquecimento em bloco digestor por 40 min em temperatura de 90°C. Após resfriamento, o extrato foi centrifugado a 3200 rpm por 5 min e 1 mL do sobrenadante foi transferido a outro frasco e diluído 10 vezes com a fase móvel (pH 7,0). Por fim, filtrado com filtro de seringa 0,22 µm de PTFE (Analítica), e transferido ao amostrador do LC-ICP-MS para análise de especificação de Cr.

### ***3.3.4 Estratégia de otimização***

#### ***3.3.4.1 Espécies de As***

Para a otimização do método de especiação As foi empregada a matriz Doehlert, sendo avaliados os parâmetros críticos para a extração das espécies de As nos diferentes tipos de pescado. Os níveis estudados foram adaptados a partir de trabalhos já descritos na literatura e experimentos preliminares [174,193]. Os fatores e níveis estudados foram: temperatura (70, 80 e 90°C) e tempo (15, 22,5, 30, 37,5 e 45 min). Para análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICA 12 com nível de confiança fixo em 95%.

Para obter uma condição única experimental para todas as espécies, a Recuperação Cromatográfica (RC) foi empregada como resposta. Para isso a Equação 3.1 foi empregada, onde RC corresponde ao percentual de recuperação cromatográfica,  $C_e$  corresponde à concentração total de As no extrato e  $C_{As(III)}$ ,  $C_{As(V)}$ ,  $C_{MMA}$ ,  $C_{DMA}$  e  $C_{AsB}$  corresponde às concentrações das espécies de As no extrato.

$$RC (\%) = \frac{(C_{As(III)} + C_{As(V)} + C_{MMA} + C_{DMA} + C_{AsB})}{C_e} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

#### ***3.3.4.2 Espécies de Cr***

O método de especiação de Cr em amostras agrícolas foi otimizado através um planejamento Box-Behnken, aos quais foram avaliados os parâmetros críticos para a extração. Os níveis estudados foram adaptados a partir de trabalho já descrito na literatura e experimentos preliminares [67,68]. Os fatores e níveis estudados foram: temperatura (50, 80 e 110°C), tempo (10, 30 e 50 min), massa (50, 100 e 150 mg) e concentração de EDTA (10, 40 e 70 mmol L<sup>-1</sup>). Para análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICA 12 com nível de confiança fixo em 95%.

Para obter uma condição única experimental para todas as espécies, a Recuperação Cromatográfica (RC) foi empregada como resposta. Para isso a equação 3.2 foi empregada, onde RC corresponde ao percentual de recuperação

cromatográfica,  $C_e$  corresponde à concentração total de cromo no extrato e  $C_{Cr(III)}$  corresponde à concentração da espécie trivalente de cromo no extrato e  $C_{Cr(VI)}$  corresponde à espécie hexavalente do cromo no extrato.

$$RC (\%) = \frac{(C_{Cr(III)} + C_{Cr(VI)})}{C_e} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Determinação de As e Cr Total

Primeiramente, para avaliar a veracidade do método de digestão para determinação de As e Cr total nas amostras foram analisados os CRMs. As frações de massas de As e Cr total obtidas por este método e suas respectivas recuperações são apresentadas na Tabela 3.2. A avaliação estatística, por meio do teste t de Student, mostrou que não há diferença significativa entre os valores obtidos e os valores certificados, com nível de confiança de 95%, sendo o valor  $t_{calculado}$  (1,56) e  $t_{tabelado}$  (2,78) para As e  $t_{calculado}$  (1,87) e  $t_{tabelado}$  (3,18) para Cr, confirmando a veracidade do método. Desta forma, as demais amostras foram analisadas e as frações de massa nos pescados estão apresentados na Tabela 3.6 para As e na Tabela 3.8 para Cr.

**Tabela 3.2 Avaliação da veracidade na determinação de As total em amostras de pescados por ICP-MS**

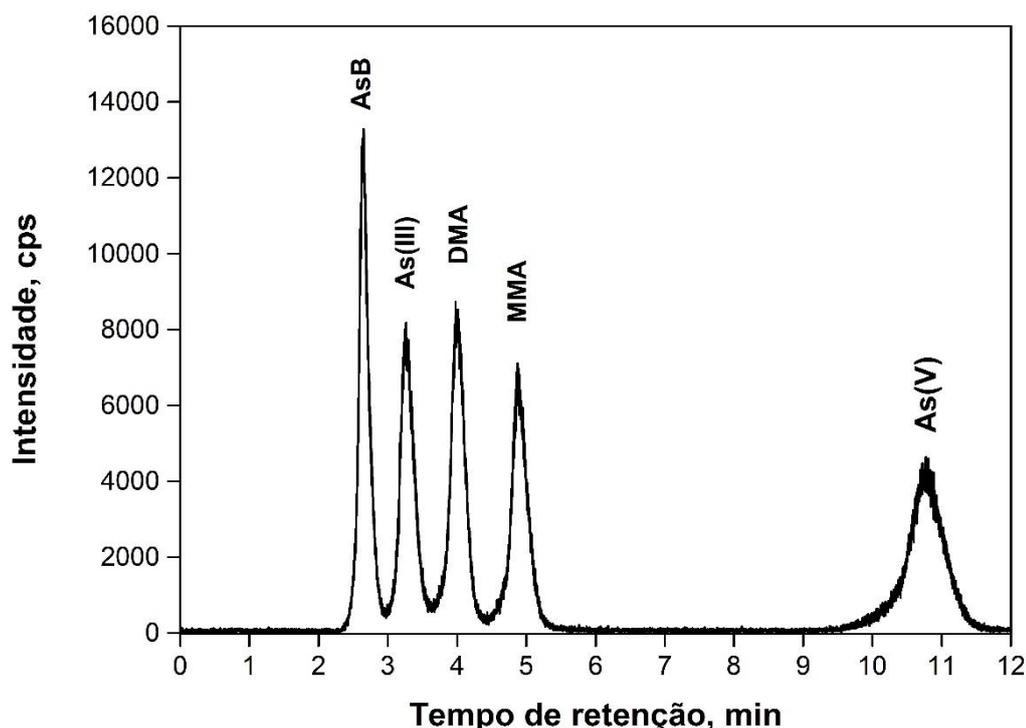
Analito	CRM <sup>a</sup>	Valor (mg kg <sup>-1</sup> )		Recuperação (%)
		Certificado	Determinado	
As	IPEN <sup>b</sup>	5,90 ± 0,27	5,80 ± 0,32	98
	DOLT-5	34,6 ± 2,4	31,02 ± 1,55	90
	DORM-4	6,80 ± 0,64	5,94 ± 0,14	87
	1566b	7,65 ± 0,65	6,64 ± 0,19	87
	TORT-3	59,5 ± 3,8	59,38 ± 1,08	99
Cr	IPEN <sup>b</sup>	-	0,117 ± 0,003	-
	DOLT-5	2,35 ± 0,58	2,012 ± 0,030	87
	DORM-4	1,87 ± 0,16	1,847 ± 0,037	98
	1566b	-	0,554 ± 0,036	-
	TORT-3	1,95 ± 0,24	1,782 ± 0,045	91
	2701	4,26 ± 0,12	4,24 ± 0,35	99

a: Material de referência certificado, b: material de referência

### ***3.4.2 Otimização da separação cromatográfica das espécies de As e Cr***

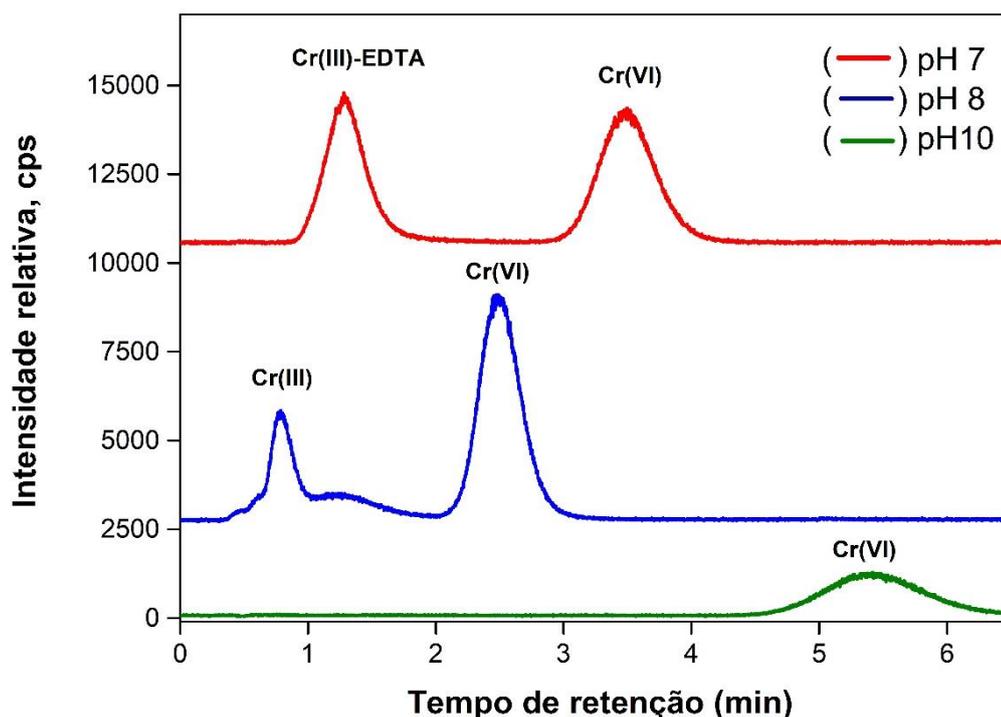
A fase móvel 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  diluída em 1% (v/v) de metanol (pH 8,0) foi selecionada, tendo em vista a separação, resolução e tempo relativamente curto, mesmo utilizando o modo isocrático [185,194]. A partir da fase móvel de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 mmol L<sup>-1</sup> foi efetuada apenas uma otimização, com pequenos ajustes de pH (8,0 a 8,65) para a melhora da separação das espécies de As. Na Figura 3.1 é possível ser observada a influência do pH na separação cromatográfica das espécies de As. Esses parâmetros foram estudados de forma univariada com a utilização de soluções de referência de As para cada espécie (As(III), As(V), AsB, DMA e MMA).

A utilização de fase móvel com pH 8,0 favoreceu a separação entre As(III) e DMA. Com a fase móvel em pH 8,65 ocorre uma mudança das características físico-químicas do As(III), formando ácido arsenoso ( $\text{pK}_{\text{a}1}$  9,2). Desta forma, sua interação com a fase estacionária é reduzida, sendo eluído, praticamente, no mesmo tempo que a espécie DMA, condição observada em valores de pH superiores a 8,25. Por outro lado, em valores de pH mais baixo o As(III) também interage mais com a fase estacionária, devido ao maior deslocamento do equilíbrio, assim como com as outras espécies, tornando o pico mais largo, o que, conseqüentemente, prejudica o LOD. No entanto, como foi obtida uma adequada resolução para As(III) e DMA, a fase móvel com pH 8,0 foi definida para a realização das análises, mesmo com o alargamento das demais espécies.



**Figura 3.1** Separação das espécies de As usando a fase móvel  $10 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  diluída em 1% (v/v) de metanol (pH 8,0)

Já para a separação das espécies de Cr, fase móvel  $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_4 + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{EDTA} + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) foi selecionada, tendo em vista os parâmetros de separação, resolução e tempo empregando o modo isocrático [179,191]. Desta forma, a partir das fases móveis de  $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_4 + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{EDTA} + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0);  $25 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{EDTA} + 1 \text{ mmol L}^{-1} \text{NaOH}$  (pH 8,0) e  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{EDTA}$  (pH 10,0), foi efetuado uma otimização para melhorar a separação das espécies de Cr. De acordo a Figura 3.2 é possível observar a influência do pH e composição da fase móvel na separação cromatográfica das espécies de Cr. Estes parâmetros foram estudados de forma univariada, com a utilização de soluções de referência de Cr para cada espécie (Cr(III) e Cr(VI)).



**Figura 3.2** Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de Cr. Injeção de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo Cr(III) e Cr(VI) usando fase móvel composta de 15 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 5 mM EDTA + 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  com (—) pH = 7,0; 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 5mM EDTA + 1mM NaOH com (—) pH = 8,0 e 5 mM EDTA (—) com pH = 10,0.

A fase móvel em pH 10,0 não se mostrou capaz de separar a espécie Cr(III), além de apresentar um maior tempo de eluição para o Cr(VI), levando a um maior custo de análise devido ao maior tempo de corrida cromatográfica e consequente maior gasto de fase móvel. Em pH 8,0 houve a separação das duas espécies do cromo, no entanto, para o Cr(III) a definição do pico não foi adequada e isso é caracterizado pela baixa solubilidade nesse meio. Já em pH 7,0 observou-se tanto resolução adequada, quanto uma definição de pico, pois a complexação do Cr(III)-EDTA foi efetiva, convertendo o Cr(III) a sua forma complexada, facilitando a separação e determinação deste analito.

### 3.4.3 Otimização das condições de extração das espécies de As e Cr

#### 3.4.3.1 Arsênio

A otimização das extrações das espécies de As foi realizada empregando planejamentos experimental Doehlert. Matrizes experimentais contendo 9 experimentos cada foram utilizadas para otimizar as condições de extração das espécies e os fatores temperatura e tempo foram estudados em amostras de pescados. Fatores também relevantes, como massa de amostra e solução extratora foram adaptados de trabalhos previamente descritos na literatura [89,174]. A Tabela 3.3 mostra o planejamento experimental Doehlert aplicado com valores reais e codificados e a resposta analítica em função da recuperação cromatográfica.

**Tabela 3.3 Matriz do planejamento Doehlert para otimização dos fatores envolvidos na extração das espécies de As em pescados**

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	RC(%) <sup>a</sup>
1	30,0 (0)	80 (0)	88,4 <sup>b</sup> /85,1 <sup>c</sup>
2	45,0 (1)	80 (0)	85,7 <sup>b</sup> /83,2 <sup>c</sup>
3	37,5 (0,5)	90 (0,866)	96,1 <sup>b</sup> /92,3 <sup>c</sup>
4	15,0 (-1)	80 (0)	65,4 <sup>b</sup> /65,1 <sup>c</sup>
5	22,5 (-0,5)	70 (-0,866)	75,7 <sup>b</sup> /75,0 <sup>c</sup>
6	37,5 (0,5)	70 (-0,866)	69,3 <sup>b</sup> /69,4 <sup>c</sup>
7	22,5 (-0,5)	90 (0,866)	80,3 <sup>b</sup> /80,1 <sup>c</sup>
8	30,0 (0)	80 (0)	89,2 <sup>b</sup> /86,0 <sup>c</sup>
9	30,0 (0)	80 (0)	88,5 <sup>b</sup> /85,5 <sup>c</sup>

a: Recuperação Cromatográfica; b: resposta analítica para amostra de camarão; c: resposta analítica amostra de molusco bivalve

A importância da validação do modelo foi exposta nos capítulos anteriores e por isso realizou-se o teste da falta de ajuste, avaliação dos valores predito versus valores observados e resíduos versus valores preditos. Os modelos matemáticos são descritos pela Equação 3.3 para a amostra de camarão e Equação 3.4 para a amostra de molusco bivalve.

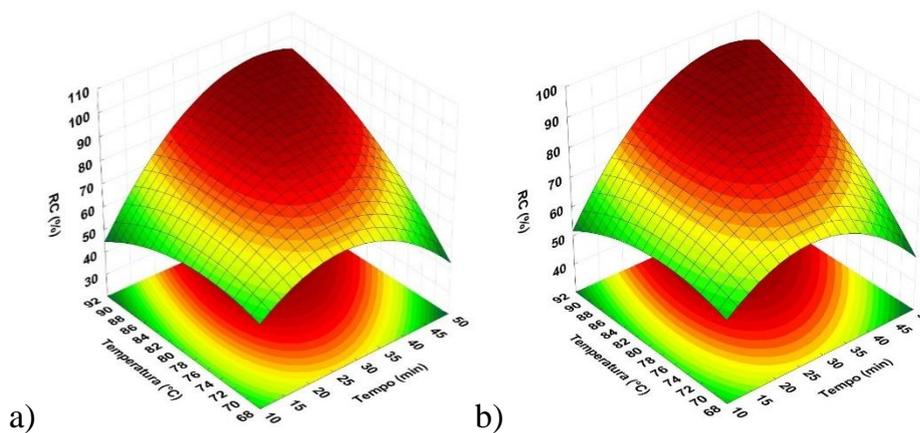
$$\text{Recuperação Cromatográfica} = 88,76 \pm 0,28 + 8,29 \pm 0,24 (\text{Temperatura}) - 6,17 \pm 0,37 (\text{Temperatura}^2) + 3,41 \pm 0,17 (\text{Tempo}) - 2,84 \pm 0,13 (\text{Tempo}^2) + 4,97 \pm 0,22 (\text{Temperatura} \times \text{Tempo})$$

Equação 3.3

$$\text{Recuperação Cromatográfica} = 85,85 \pm 0,28 + 7,35 \pm 0,24 (\text{Temperatura}) - 4,86 \pm 0,37 (\text{Temperatura}^2) + 2,73 \pm 0,17 (\text{Tempo}) - 2,34 \pm 0,13 (\text{Tempo}^2) + 3,79 \pm 0,22 (\text{Temperatura} \times \text{Tempo})$$

Equação 3.4

Por meio da análise de variância do modelo, foi verificado que todos os termos foram estatisticamente significativos. Adicionalmente, o sinal positivo para os fatores e sua interação indicam que em temperatura e tempo moderadamente elevados há uma maior extração das espécies de As. Esta condição foi observada para os dois modelos gerados a partir da análise dos pescados. Análise de variância foi realizada com um nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação foi maior que 0,97, indicando uma ótima concordância entre os valores preditos e os valores observados. A resposta máxima foi determinada aplicando os critérios de Lagrange, sendo a melhor condição estabelecida foi tempo de 40 min em temperatura de 90°C para maior extração das espécies de As. Estas condições estão demonstradas nas superfícies de resposta Figura 3.3.



**Figura 3.3 Superfícies de resposta obtida a partir do planejamento experimental Doehlert para as variáveis temperatura *versus* tempo em a) camarão e b) molusco bivalve**

### 3.4.3.2 Cr

A otimização das extrações das espécies de Cr foi realizada empregando um planejamento experimental Box-Behnken. Uma matriz experimental contendo 27 experimentos foi utilizada para otimizar as condições de extração das espécies e os fatores temperatura, concentração do EDTA [EDTA], tempo e massa foram estudados em amostra de pescado. Em todos os experimentos foram adicionados  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cr(VI), pois, segundo a literatura não é esperado esta espécie química em alimentos [68]. A Tabela 3.4 mostra o planejamento Box-Behnken aplicado com valores reais e codificados e a resposta analítica em função da recuperação cromatográfica.

Após obtenção dos resultados o modelo foi validado mediante os parâmetros supracitados. Desta forma, o modelo matemático desenvolvido pode ser descrito pela Equação 3.5 para a amostra de pescado.

$$\begin{aligned} \text{Recuperação Cromatográfica} = & 49,39 \pm 0,46 + 1,99 \pm 0,40 (\text{Temperatura}) + 5,65 \pm 0,30 \\ & (\text{Temperatura}^2) + 4,62 \pm 0,40 \text{ Tempo} + 3,95 \pm 0,30 (\text{Tempo}^2) + 1,84 \pm 0,40 (\text{Massa}) + 6,99 \pm 0,30 (\text{Massa}^2) + \\ & 6,16 \pm 0,40 ([\text{EDTA}]) + 8,71 \pm 0,30 ([\text{EDTA}]^2) + 9,77 \pm 0,69 (\text{Temperatura} \times \text{Tempo}) - 3,63 \pm 0,69 (\text{Tempo} \times \\ & \text{Massa}) \end{aligned}$$

Equação 3.5

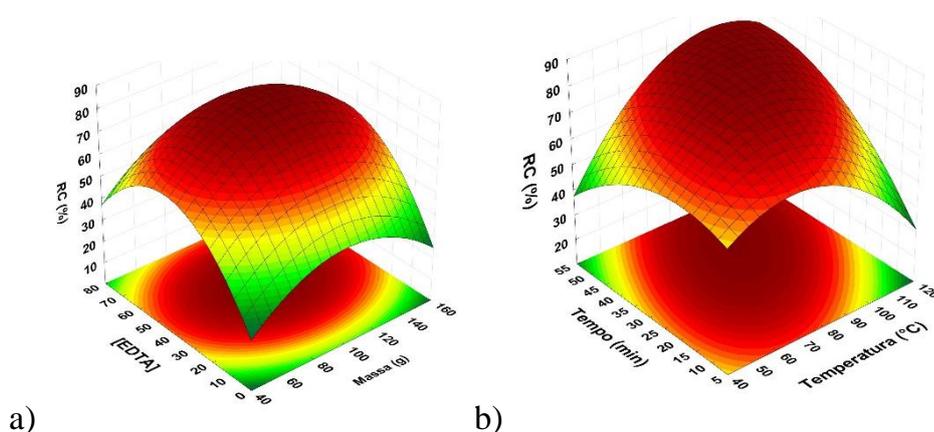
**Tabela 3.4 Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores envolvidos na extração das espécies de Cr**

Exp <sup>a</sup>	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Massa (g)	[EDTA]	RC (%) <sup>b</sup>
1	50,0 (-1)	10,0 (-1)	100,0 (0)	40,0 (0)	64,6
2	110,0 (1)	10,0 (-1)	100,0 (0)	40,0 (0)	50,0
3	50,0 (-1)	50,0 (1)	100,0 (0)	40,0 (0)	61,8
4	110,0 (1)	50,0 (1)	100,0 (0)	40,0 (0)	86,4
5	80,0 (0)	30,0 (0)	50,0 (-1)	10,0 (-1)	48,0
6	80,0 (0)	30,0 (0)	150,0 (1)	10,0 (-1)	47,4
7	80,0 (0)	30,0 (0)	50,0 (-1)	70,0 (1)	58,2
8	80,0 (0)	30,0 (0)	150,0 (1)	70,0 (1)	60,9
9	80,0 (0)	30,0 (0)	100,0 (0)	40,0 (0)	81,8
10	50,0 (-1)	30,0 (0)	100,0 (0)	10,0 (-1)	49,1
11	110,0 (1)	30,0 (0)	100,0 (0)	10,0 (-1)	48,5
12	50,0 (-1)	30,0 (0)	100,0 (0)	70,0 (1)	59,1
13	110,0 (1)	30,0 (0)	100,0 (0)	70,0 (1)	59,1
14	80,0 (0)	10,0 (-1)	50,0 (-1)	40,0 (0)	49,1
15	80,0 (0)	50,0 (1)	50,0 (-1)	40,0 (0)	63,7
16	80,0 (0)	10,0 (-1)	150,0 (1)	40,0 (0)	65,5
17	80,0 (0)	50,0 (1)	150,0 (1)	40,0 (0)	65,5
18	80,0 (0)	30,0 (0)	100,0 (0)	40,0 (0)	84,6
19	50,0 (-1)	30,0 (0)	50,0 (-1)	40,0 (0)	53,7
20	110,0 (1)	30,0 (0)	50,0 (-1)	40,0 (0)	58,2
21	50,0 (-1)	30,0 (0)	150,0 (1)	40,0 (0)	51,8
22	110,0 (1)	30,0 (0)	150,0 (1)	40,0 (0)	61,8
23	80,0 (0)	10,0 (-1)	100,0 (0)	10,0 (-1)	49,7

24	80,0 (0)	50,0 (1)	100,0 (0)	10,0 (-1)	47,9
25	80,0 (0)	10,0 (-1)	100,0 (0)	70,0 (1)	59,1
26	80,0 (0)	50,0 (1)	100,0 (0)	70,0 (1)	68,2
27	80,0 (0)	30,0 (0)	100,0 (0)	40,0 (0)	82,8

a: Experimento; b: Recuperação Cromatográfica

Por meio da análise do modelo, foi verificado que apenas todos os termos lineares, quadráticos e as interações temperatura *versus* tempo, tempo *versus* massa foram estatisticamente significativos. Adicionalmente, o sinal positivo nos parâmetros e interações, indicam que esses parâmetros devem ser aplicados em níveis moderadamente altos. Mais uma vez, a análise de variância foi realizada a 95% de confiança e o coeficiente de correlação estimado foi 0,94. Portanto, isso indica uma satisfatória concordância entre os valores determinados e preditos pelo modelo. O critério de Lagrange permite caracterizar o ponto crítico como máximo, e para encontrar as coordenadas do ponto crítico, a primeira derivada da função foi ajustada em relação a cada variável e obte-se um sistema de equações do 1º grau. Ao resolver esses sistemas, encontrou-se as coordenadas do ponto ótimo. E as condições ótimas estabelecidas para extração das espécies de Cr são: temperatura 90 °C, tempo 40 min, massa 100 mg e 45 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA em pH 10,0 com solução extratora. Estas condições estão demonstradas nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 3.4.



**Figura 3.4 Superfícies de resposta obtida a partir do planejamento Box-Behnken para as variáveis: a) [EDTA] *versus* Massa e b) Tempo *versus* temperatura**

### **3.4.4 Parâmetros analíticos**

Para as espécies de As em 12 min obteve-se a separação completa e para as espécies de Cr em 6 min obteve-se a completa separação, com uma boa resolução para ambos métodos. A quantificação das espécies de As e Cr foram realizadas por calibração externa, com faixa de 0,1 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  como As ou Cr, integrando a área do sinal analítico de cada espécie e correlacionando com a concentração. A curva de calibração apresentou uma boa correlação linear,  $R^2 > 0,9998$ , para todas as espécies de As e Cr. O LOD e o LOQ foram obtidos a partir de  $LD=3\times EP/S$  e  $LQ=10\times EP/S$ , respectivamente, na qual  $EP$  e  $S$  correspondem ao erro padrão e a inclinação da regressão linear, respectivamente [62,131]. Limites de quantificação de 5,3; 52,1; 16,4; 2,8; 83,3  $\text{ng g}^{-1}$  (como As) foram obtidos para AsB, As(III), DMA, MMA e As(V), respectivamente. Já para o Cr limites de quantificação 113,8 e 53,9  $\text{ng g}^{-1}$  (como Cr) foram obtidos para Cr(III) e Cr(VI), respectivamente.

### **3.4.5 Validação e aplicação**

#### **3.4.5.1 As**

Na avaliação da recuperação das espécies de As nas diferentes amostras de pescado, foram adicionadas diferentes concentrações das espécies de As (AsB, As(III), As(V), DMA e MMA) nas amostras liofilizadas. A concentração adicionada foi efetuada na mesma ordem de grandeza da concentração original de As já presente em cada amostra, e no caso das espécies de As que se encontravam originalmente abaixo do LOQ, a quantidade correspondente à concentração de cerca de 3 vezes o LOQ da respectiva espécie foi adicionada na solução de determinação (considerando a etapa de extração e diluição do extrato). Os dados estão apresentados na Tabela 3.5. A recuperação das espécies de As foram consideradas como quantitativas para todas as amostras, visto que em análise de especiação, recuperações de 70 a 120% podem ser consideradas satisfatórias [195].

**Tabela 3.5 Resultados dos ensaios de adição recuperação (%) das espécies de As (n = 3)**

Amostra	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Linguado	97-101	99-103	90-94	96-99	99-104
Molusco bivalve	92-104	88-93	93-97	95-98	97-100
Camarão SSB	97-103	92-96	91-95	87-91	91-95

De forma complementar, a veracidade do método foi avaliada através da análise dos CRMs (DOLT-5, DORM-4, TORT-3 e 1566b) e do material de referência produzido pelo IPEN. Os resultados mostraram-se concordantes com o valor certificado de As, para um intervalo de confiança de 95% (Tabela 3.6). O método proposto (usando  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  diluída em 1% de metanol em pH 8,0 como fase móvel, 100 mg de amostra e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  como solução extratora) foi aplicado para especificação de As em peixes, molusco bivalve e camarão. Os cromatogramas e os resultados estão apresentados na Figura 3.5 e Tabela 3.6.

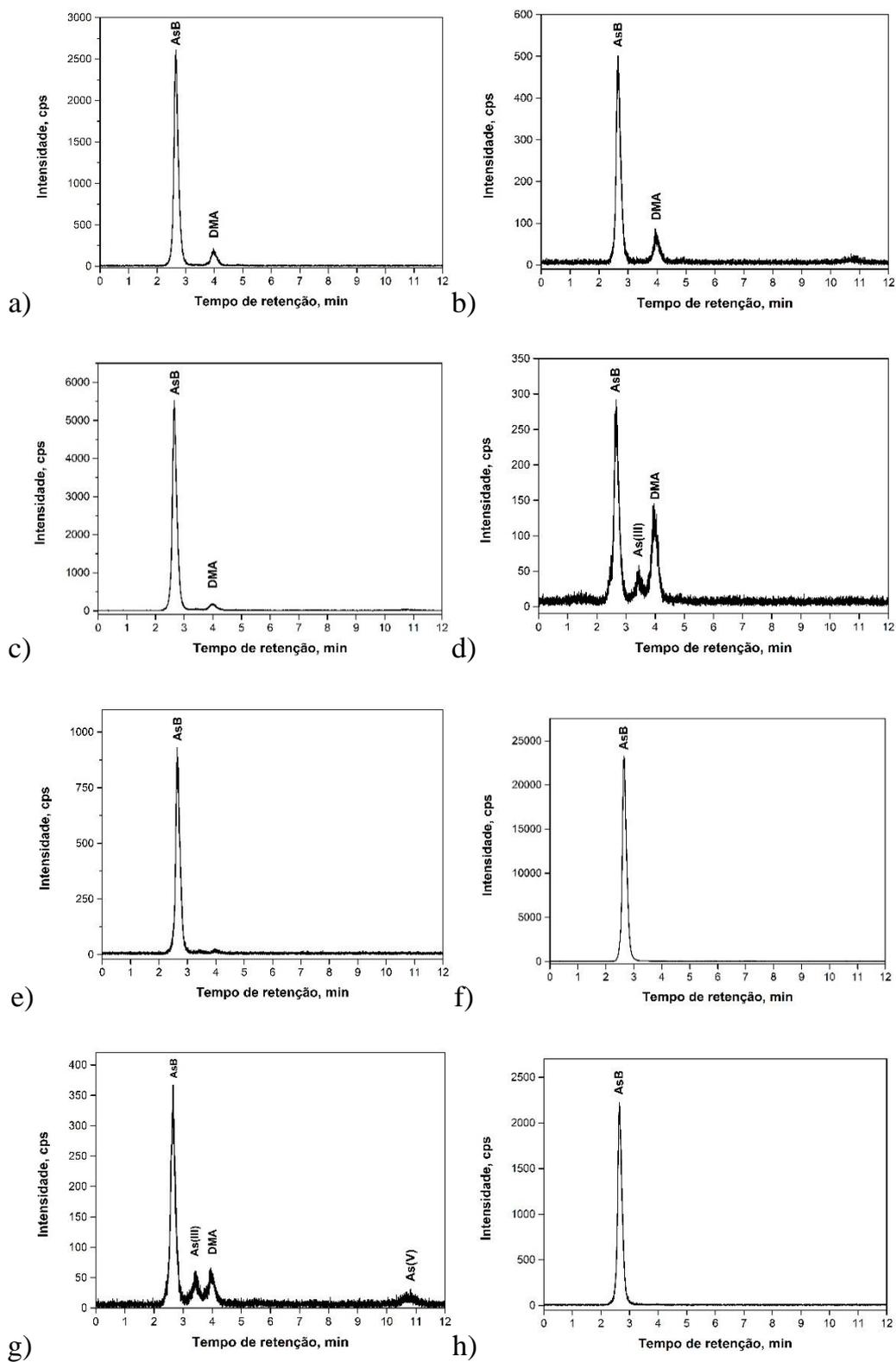
Avaliar diferentes tipos de amostras foi importante, pois mesmo se tratando de pescado, as diferentes espécies apresentam peculiaridades quanto a sua composição e o método de extração proposto poderia não ser adequado a todas as amostras analisadas.

**Tabela 3.6 Fração de massa de As total e espécies de As em pescados e CRMs e MR empregando o método proposto (média ± desvio padrão, mg kg<sup>-1</sup>, n=3)**

<b>Amostras</b>	<b>AsB</b>	<b>As(III)</b>	<b>DMA</b>	<b>MMA</b>	<b>As(V)</b>	<b>∑ As</b>	<b>Total As</b>
IPEN <sup>a</sup>	5,15 ± 0,08	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	5,15 ± 0,08	5,80 ± 0,32
DOLT-5 <sup>b</sup>	29,17 ± 1,31	< 0,052	0,031 ± 0,02	< 0,003	< 0,025	29,20 ± 1,33	31,02 ± 1,55
DORM-4 <sup>b</sup>	5,37 ± 0,08	< 0,052	0,015 ± 0,01	< 0,003	< 0,025	5,38 ± 0,09	5,94 ± 0,14
1566b <sup>b</sup>	4,8 ± 0,28	0,056 ± 0,01	1,50 ± 0,02	< 0,003	< 0,025	6,36 ± 0,31	6,64 ± 0,19
TORT-3 <sup>b</sup>	54,24 ± 0,78	< 0,052	0,022 ± 0,01	< 0,003	< 0,025	54,26 ± 0,79	59,78 ± 1,08
Camarão Carne SSb	11,81 ± 0,30	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	11,81 ± 0,30	12,55 ± 0,44
Camarão Casca SSb	4,66 ± 0,07	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	4,66 ± 0,07	4,48 ± 0,02
Camarão Cabeça SSb	15,75 ± 0,55	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	15,75 ± 0,55	16,00 ± 0,40
Camarão Patas SSb	6,59 ± 0,30	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	6,59 ± 0,30	6,65 ± 0,37
Camarão Natu Br	1,72 ± 0,09	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	1,72 ± 0,09	2,05 ± 0,10
Molusco Bivalve	4,25 ± 0,09	0,080 ± 0,004	0,090 ± 0,006	< 0,003	0,031 ± 0,003	4,45 ± 0,10	4,81 ± 0,11
Arabaiana	5,41 ± 0,14	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	5,41 ± 0,14	5,62 ± 0,16
Bijupirá	4,875 ± 0,07	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	4,87 ± 0,07	5,22 ± 0,09
Sardinha	56,75 ± 1,14	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	56,75 ± 1,14	60,1 ± 1,4
Corvina	10,1 ± 0,35	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	10,1 ± 0,35	9,52 ± 0,30
Cação	100,0 ± 3,1	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	100,0 ± 3,1	106,5 ± 2,88
Linguado	5,24 ± 0,08	< 0,052	< 0,016	< 0,003	< 0,025	5,24 ± 0,08	5,49 ± 0,07

a: Material de referência certificado, b: material de referência, SSb: São Sebastião.

Valores certificados, mg kg<sup>-1</sup>, DOLT-5 (34,6 ± 2,4), DORM-4 (6,80 ± 0,64), TORT-3(59,5 ± 3,8), 1566b (7,65 ± 0,65), IPEN (5,90 ± 0,27).



**Figura 3.5** Cromatogramas das espécies de As em a) DOLT-5, b) DORM-4, c) TORT-3 d) 1566b, e) IPEN, f) cação, g) molusco bivalve e h) camarão

O somatório das espécies de As utilizando as condições selecionadas está de acordo os valores totais As obtido pelo método de digestão para todas as amostras de pescado, para um intervalo de confiança de 95%. Segundo a legislação brasileira vigente [7], todas as amostras estão acima do limite máximo ( $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ) de As recomendado. No entanto, existem controvérsias a respeito do limite máximo de As total em pescado, visto que AsB é a espécie predominante nas amostras.

Em relação as espécies de As analisadas nos pescados, para todas as amostras de peixe e camarão, AsB foi a única espécie presente. Já para o molusco bivalve, a AsB é a espécie predominante, porém foram determinadas também pequenas quantidades de DMA, As(III) e As(V). É importante mencionar que a AsB é uma espécie de As não tóxica para os humanos indicando que as amostras seriam adequadas ao consumo. O valor provisório de tolerância de ingestão semanal de  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$  por massa corporal de As inorgânico, foi proposto pela União Europeia, No entanto, a FAO e a WHO concluíram que esse valor apresentava risco e o considerou inadequado. Em função desta controvérsia o valor provisório de tolerância foi revogado e atualmente não existe na legislação limite máximo de As em pescado que seria tolerado para ingestão, sendo necessário o estabelecimento de legislação específica para as espécies de As em pescado [87,102,178].

### **3.4.5.2 Cr**

A proposição de métodos que contemplem a extração das espécies de Cr(III) e Cr(VI) sem a perda de estabilidade é um desafio, pois o Cr(VI) é estável apenas em meio básico e neste ambiente somente uma parte do Cr(III) é extraível, que é o Cr(III) solúvel. Devido à ausência de Cr(VI) nas amostras e nos CRMs, foi realizado experimento que envolveu a adição e recuperação das espécies Cr(III) e Cr(VI) nas amostras de linguado, molusco bivalve, camarão SSb e nos CRMs, DORM-4, DOLT-5 e TORT-3.

Na avaliação da recuperação das espécies de Cr nas diferentes amostras de pescados, foram adicionadas diferentes concentrações das espécies de Cr (Cr(III) e Cr(VI)) nas amostras liofilizadas. A concentração adicionada foi efetuada na mesma ordem de grandeza da concentração original de Cr já presente nas amostras e no caso das espécies de Cr que se encontravam originalmente abaixo do LOQ, a quantidade

correspondente à concentração de cerca de 3 vezes o LOQ da respectiva espécie foi adicionada na solução de determinação (considerando as etapas de extração e diluição do extrato). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.7, sendo que as recuperações das espécies de Cr foram consideradas como quantitativas para todas as amostras, considerando que em análise de especiação, recuperações de 70 a 120% podem ser consideradas satisfatórias [195].

**Tabela 3.7 Resultados dos ensaios de adição e recuperação das espécies de Cr (n=3)**

<b>Amostra</b>	<b>Cr(III) %</b>	<b>Cr(VI) %</b>
Linguado	92-104	88-93
Molusco bivalve	97-101	90-96
Camarão SSB	92-103	91-99
DOLT-5	95-101	91-95
DORM-4	87-98	90-97
TORT-3	92-96	89-98

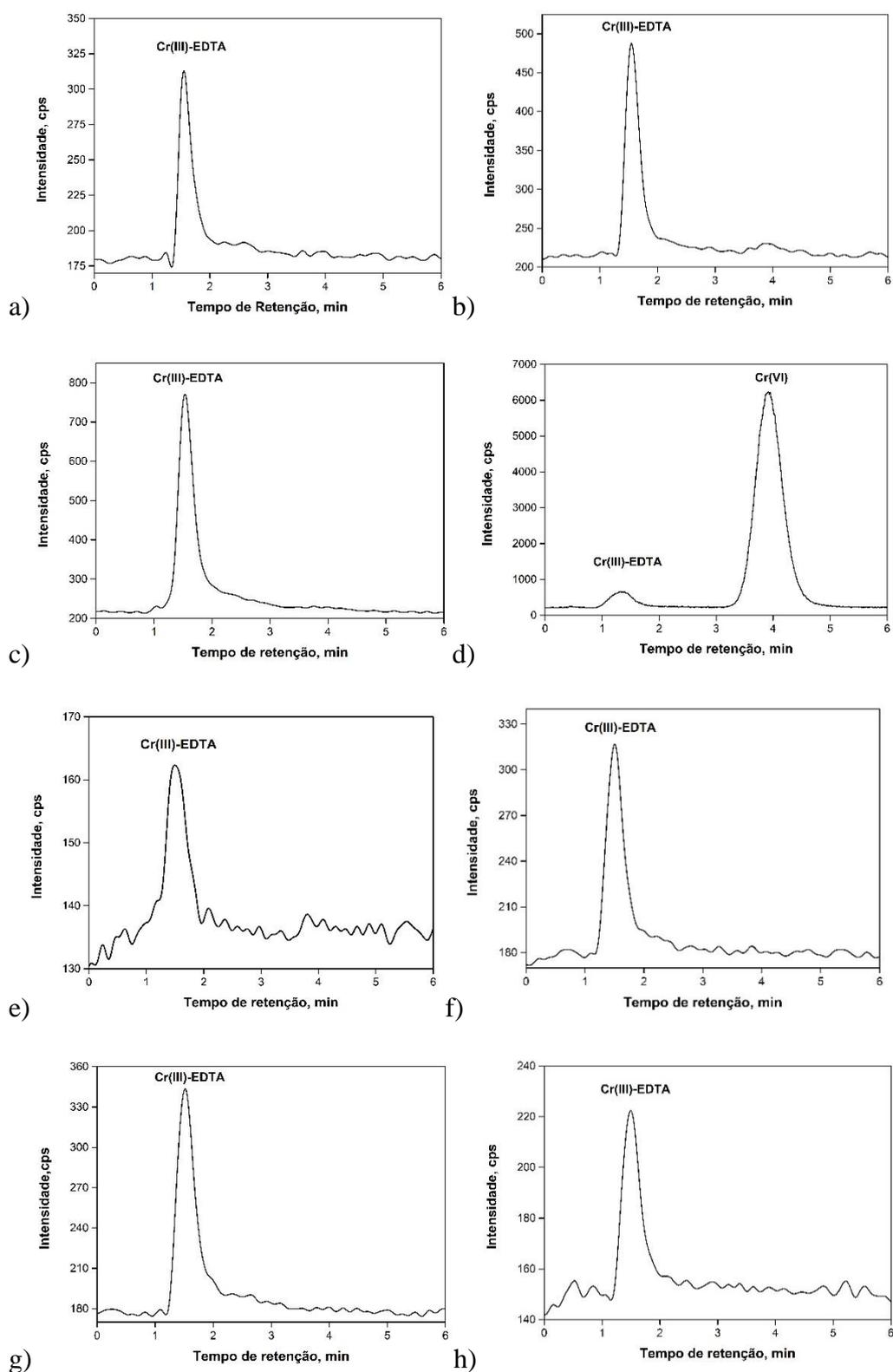
Adicionalmente, a veracidade do método para a espécie Cr(VI) foi avaliada através da análise do CRM solo contaminado com cromo hexavalente (NIST-2701). O resultado para o Cr hexavalente,  $535 \pm 24,2 \mu\text{g/g}$ , mostrou-se concordante com o valor certificado de Cr(VI), para um intervalo de confiança de 95%, apresentando recuperação de 97%. O método proposto (usando  $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA} + 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$  em pH 7,0 como fase móvel, 100 mg de amostra e  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA em pH 10 como solução extratora) foi aplicado para especiação de Cr em peixes, molusco bivalve e camarão. Os cromatogramas e os resultados são apresentados na Figura 3.6 e Tabela 3.8.

**Tabela 3.8 Fração de massa de Cr total, espécies de Cr em pescados e CRMs e MR empregando o método proposto (média  $\pm$  desvio padrão, mg kg<sup>-1</sup>, n=3)**

<b>Amostra</b>	<b>Cr Total</b>	<b>Cr(III)</b>	<b>Cr(VI)</b>	<b>Cr(III) solúvel (%)</b>
Ipen <sup>a</sup>	0,117 $\pm$ 0,003	0,015 $\pm$ 0,001	< 0,054	12,7
DOLT-5 <sup>b</sup>	2,012 $\pm$ 0,030	0,449 $\pm$ 0,007	< 0,054	22,3
DORM-4 <sup>b</sup>	1,847 $\pm$ 0,037	0,206 $\pm$ 0,004	< 0,054	11,2
1566b <sup>b</sup>	0,554 $\pm$ 0,036	0,141 $\pm$ 0,009	< 0,054	25,5
TORT-3 <sup>b</sup>	1,782 $\pm$ 0,045	1,025 $\pm$ 0,026	< 0,054	57,5
Camarão São Sebastião (Carne)	0,304 $\pm$ 0,008	0,093 $\pm$ 0,002	< 0,054	30,5
Camarão São Sebastião (Casca)	0,378 $\pm$ 0,013	0,120 $\pm$ 0,004	< 0,054	31,8
Camarão São Sebastião (Cabeça)	0,828 $\pm$ 0,037	0,101 $\pm$ 0,005	< 0,054	12,2
Camarão São Sebastião (Patatas)	0,467 $\pm$ 0,016	0,187 $\pm$ 0,007	< 0,054	40,1
Camarão Natu Br	2,034 $\pm$ 0,051	0,143 $\pm$ 0,004	< 0,054	7,0
Molusco Bivalve	10,95 $\pm$ 0,110	0,674 $\pm$ 0,007	< 0,054	6,2
Arabaiana	0,324 $\pm$ 0,011	0,075 $\pm$ 0,003	< 0,054	23,3
Bijupirá	0,554 $\pm$ 0,028	0,073 $\pm$ 0,004	< 0,054	13,2
Sardinha	0,485 $\pm$ 0,036	0,069 $\pm$ 0,005	< 0,054	14,3
Corvina	0,568 $\pm$ 0,020	0,072 $\pm$ 0,003	< 0,054	12,6
Cação	2,936 $\pm$ 0,029	0,337 $\pm$ 0,003	< 0,054	11,5
Linguado	2,415 $\pm$ 0,181	0,246 $\pm$ 0,018	< 0,054	10,2

a: Material de referência certificado, b: material de referência.

Valores certificados, mg kg<sup>-1</sup>, DOLT-5 (2,35  $\pm$  0,58), DORM-4 (1,87  $\pm$  0,16), TORT-3(1,95  $\pm$  0,24).



**Figura 3.6** Cromatogramas das espécies de Cr em a) DOLT-5, b) DORM-4, c) TORT-3 d) NIST (2701), e) Sardinha, f) Molusco Bivalve, g) camarão NatuBr e h) Camarão SSb.

A espécie de Cr(III) é a predominante nas amostras de pescado, de acordo com os resultados obtidos. O somatório das espécies de Cr utilizando as condições selecionadas não está de acordo com a fração de massa de Cr total obtida pelo método de digestão para todas as amostras de pescado, pois, como explicitado anteriormente, apenas uma parte do Cr(III) é solúvel na solução alcalina extratora. Não há legislação que regule o teor de Cr em pescados, mesmo sendo esse analito altamente cancerígeno e aparentemente com baixa essencialidade ao organismo humano, segundo avaliação de estudos da União Europeia [92].

### **3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS**

O método desenvolvido para especiação de As em amostras de peixes, camarões e molusco bivalve foi otimizado para cada matriz individualmente, considerando as suas particularidades e possíveis interferências por LC-ICP-MS. A aplicação da extração com 30 mmol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> como solução extratora, em 40 min a 90 °C permitiu extrair as espécies de As, as quais foram determinadas com resolução adequada e um tempo curto. O método proposto apresentou bons parâmetros analíticos caracterizado por sua ótima sensibilidade, linearidade e seletividade. Segundo a legislação da Anvisa, todas as amostras se apresentaram acima do limite máximo permitido para pescados. No entanto, como esperado, AsB foi a espécie química principal presente nas amostras.

Um outro método foi desenvolvido para especiação de Cr(VI) e Cr(III) solúvel em amostras de peixes, molusco, camarões e solo por LC-ICP-MS. A extração das espécies químicas de Cr deu-se em solução extratora alcalina 45 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA por 40 min em 90°C, sendo as espécies determinadas com resolução cromatográfica adequada, com ótima sensibilidade, linearidade e boa seletividade. A espécie presente nas amostras foi o Cr(III), como previsto em amostras alimentícias.

## Capítulo 4

### *Especiação de Cromo em Fertilizantes Orgânicos por Extração em Ponto Nuvem e Otimização por meio de Planejamento Experimental Doehlert como Suporte para Aspectos Legislativos*

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional está diretamente ligado à produção agrícola. Neste cenário, fertilizantes minerais e orgânicos desempenham um papel vital no desenvolvimento de plantas, fornecendo ao solo os nutrientes necessários. Os fertilizantes orgânicos são produzidos com matérias-primas da indústria, setores urbano e rural. Devido aos diversos tipos de fertilizantes desses diferentes segmentos, a caracterização química desses materiais é de importância fundamental, pois fornece dados sobre nutrientes e possíveis contaminantes [5,196].

Uma categoria de fertilizantes contendo cromo (Cr) é produzida a partir de subprodutos do curtimento e do processo industrial. Esses fertilizantes contêm Cr na forma trivalente, considerado elemento traço essencial em humanos e nutrição animal. Além disso, também pode estar presente o Cr(VI) extremamente tóxico, encontrado em suas várias formas químicas ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ , e  $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Devido à sua alta mobilidade, apresenta toxicidade aguda para organismos vivos e potencial carcinogenicidade para humanos. Portanto, várias diretrizes e regulamentos tratam da determinação e controle do Cr contido nos fertilizantes. As legislações são frequentemente polêmicas e geralmente não distinguem o estado de oxidação do Cr, considerando Cr(III) e Cr(VI) como perigosos e tóxicos [197]. De outra forma, União Europeia, Estados Unidos e outros países, como Itália e o Brasil possuem legislações em que os níveis máximos admissíveis de Cr em fertilizantes orgânicos é referido como Cr(VI).

Em relação a essas diretrizes, o Regulamento da UE 2019/1009 [198] e a instrução normativa (IN) nº 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

[21] indicam, 2 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca como o máximo permitido em fertilizantes orgânicos. A extração alcalina (USEPA 3060A) [96] e determinação pelo método colorimétrico com 1,5 difenilcarbazida (DFC) para a quantificação de Cr(VI) (USEPA 7196) [97] é o método indicado pela legislação brasileira. Apesar da relativa seletividade, a extração alcalina de Cr(VI) também extrai compostos húmicos de coloração escura, dificultando a determinação colorimétrica [197,199–201].

Os compostos húmicos consistem em ácido húmico, ácido fúlvico e humina, os quais são compostos majoritários em matéria orgânica. Zhang et al. (2017) desenvolveram um estudo para avaliar o mecanismo de interação dos ácidos húmicos com o Cr(VI) e constataram que os grupos carboxílicos e fenólicos destes compostos complexam e reduzem o Cr(VI) a Cr(III) em meio ácido. O mecanismo de interação ocorre em 3 etapas: (i) adsorção do Cr(VI) pelos grupos carbonil e éster; (ii) redução do Cr(VI) para Cr(III) pelo fenol e polissacarídeos e (iii) complexação do Cr(III) reduzido pelos grupos carboxílicos [202].

Em virtude da alta concentração dos compostos húmicos nos fertilizantes orgânicos espera-se que a concentração de Cr(VI) seja baixa. Por isso, métodos de separação/pré-concentração podem ser aplicados com o propósito de determinar o Cr(VI) sem interferência. Neste sentido, vários métodos são descritos na literatura, como extração em fase sólida (SPE), adsorção, precipitação e coprecipitação, micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a extração em ponto nuvem (CPE) para a pré-concentração de Cr(VI) [203,204].

Um método de coprecipitação denominado coprecipitação sem carreador (CEFC) foi proposto por Bulut et al. (2009) para especiação de Cr em água e amostras sólidas. Um composto orgânico insolúvel em água foi usado como agente coprecipitante, evitando a necessidade de elementos carreadores para separação. Os riscos de contaminação foram minimizados e foi obtido limite de detecção de 0,7 µg L<sup>-1</sup> para Cr(III) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) [205]. Ozkantar et al. (2020) exploraram a micro-extração líquido-líquido (LLME) para especiação de Cr em amostras de água. A extração assistida por ultrassom e determinação de Cr(VI)-DFC por espectrofotometria forneceu limite de detecção de

0,76  $\mu\text{g L}^{-1}$  e um fator enriquecimento de 50 [206]. Esses procedimentos de pré-concentração não avaliaram o efeito do ácido húmico na redução do Cr(VI).

A extração em ponto nuvem foi descrita em 1976 por Watanabe et al. Vantagens relacionadas às suas propriedades como baixa toxicidade dos surfactantes e baixa volatilidade, quando comparado com os solventes orgânicos, atendendo assim aos princípios da química verde foi o grande destaque. Também, a CPE fornece altos fatores de pré-concentração e eficiência de recuperação. Em relação ao princípio do procedimento, a CPE ocorre quando surfactantes não iônicos, em soluções aquosas e em quantidade acima da concentração micelar crítica (CMC) são aquecidos acima de uma dada temperatura (ponto nuvem), causando a turvação da solução. Acima do ponto nuvem, mediante centrifugação, são formadas duas fases líquidas: i) uma que contém alta concentração de surfactante e as espécies extraídas (fase rica em surfactante) e ii) a fase aquosa que contém uma pequena concentração do surfactante próxima a CMC (fase pobre em surfactante) [207].

Considerando a necessidade de determinação de Cr(VI) sem a interferência dos ácidos húmicos, foi proposta a extração alcalina seguida de CPE para determinação de Cr(VI) em fertilizantes orgânicos por espectrofotometria UV-Vis ou FAAS. Os principais parâmetros que influenciam a extração e estabilidade do Cr(VI), como massa de amostra e volume da solução de extração para o procedimento de extração alcalina e as condições ideais de CPE foram avaliados.

## **3.2 OBJETIVO**

Esse capítulo teve como objetivo principal desenvolver um método para especiação de cromo em fertilizantes orgânicos por espectrofotometria UV-Vis e FAAS e avaliar o emprego da extração alcalina seguida da extração em ponto nuvem (CPE) para aumento da sensibilidade do método.

### 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Equipamentos

Forno de micro-ondas com frascos de polietileno modificado (polifluoramida, PFA) (ETHOS 1, Milestone, Sorisole, Itália) foi utilizado para o preparo das amostras digeridas na determinação de Cr total.

Espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda 545 nm (Femto 432, São Paulo, Brasil) com uma microcubeta (1 mL) e espectrômetro de absorção atômica com chama (SpectrAA 800, Varian, Mulgrave, Austrália) equipado com lâmpada de cátodo oco de cromo e comprimento de onda de 357,9 nm foram utilizados para a determinação de Cr(VI) e Cr total.

Para avaliação da veracidade do método foi empregada cromatografia líquida associada a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS) (LC 1200 e ICP-MS 7800, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) equipado com coluna de troca aniônica (G3268-80001, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) para separação de Cr(III)/Cr(VI), kit de conexão LC (G1833-65200, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão), He pressurizado (99,9999%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, São Paulo, Brasil), e argônio de alta pureza (99,999%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, São Paulo, Brasil), utilizado para geração do plasma e gás de nebulização. O método de configuração integrado e controle sequencial do sistema combinado LC-ICP-MS foi realizado a partir do software ICP-MS MassHunter (MH) (Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão). Os parâmetros instrumentais operacionais e isótopos monitorados são apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 Parâmetros instrumentais aplicados na especiação por LC-ICP-MS**

Parâmetros instrumentais	Condições operacionais
Potência de radio-frequência (W)	1550
Profundidade de amostragem (mm)	8
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,1
Vazão do gás He na cela de reação (mL min <sup>-1</sup> )	4,5
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott , duplo passo
Isótopo	<sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr

**Condições LC**

Fase móvel	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25 mmol L <sup>-1</sup> + NaOH 1 mmol L <sup>-1</sup> , pH 8,0
Taxa de vazão da fase móvel (mL min <sup>-1</sup> )	0,8, isocrático
Volume de injeção (µL)	50

**Parâmetros de aquisição**

Acquisição	Análise Resolvida no Tempo (TRA)
Tempo de permanência (s)	1,0 para m/z = 52
Tempo de análise (s)	300

Centrífuga com capacidade para tubos de 15 e 50 mL (Excelsa II 206 BL, FANEM, São Paulo, Brasil) e banho de aquecimento (banho Dubnoff, NT232 Nova Técnica, São Paulo, Brasil) estabilizado em 90-95 °C com agitação contínua foram usados durante preparo de extração das amostras.

### **3.3.2 Reagentes, soluções padrão**

Todas as diluições e soluções foram preparadas com água desionizada (Milli-QTM, Millipore, Bedford, MA, EUA). Os materiais de vidro e polipropileno usados foram descontaminadas com ácido nítrico a 10% (v v<sup>-1</sup>) por 24 h e enxaguados com água. Ácido nítrico sub-destilado (Synth, Diadema, SP, Brasil) e peróxido de

hidrogênio 30% (m m<sup>-1</sup>) (Sigma Aldrich, Alemanha) foram usados para decomposição ácida.

A solução de extração foi preparada com NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup>. Esta solução foi armazenada em frasco de polietileno a 20–25°C [6]. O pH da solução de extração, ≥11,5, foi verificado antes do uso. Solução tampão de fosfato, 0,5 mol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em pH 7, DFC 1% (m v<sup>-1</sup>) armazenado em um frasco âmbar e solução de surfactante Triton X-100 a 4% (v v<sup>-1</sup>) foram as outras soluções utilizadas [97].

Soluções estoque padrão para as curvas de calibração e testes de adição de padrão foram preparadas a partir de soluções estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cr (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça) e 1000 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) preparadas a partir de dicromato de potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil) após sucessivas diluições com água. Soluções padrão de 15 a 250 µg L<sup>-1</sup> e 20 a 1000 µg L<sup>-1</sup> Cr(VI) para as determinações por UV-VIS e FAAS, respectivamente, foram preparadas. No método CPE foi utilizado um volume de 10 mL de solução de NaCl 7% (m v<sup>-1</sup>), ajustado o pH para 1,5 ± 0,5 com solução de HNO<sub>3</sub>.

### 3.3.3 Amostras

Das seis amostras de fertilizantes orgânicos (FO) analisadas, duas foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (MAPA), sendo estas amostras provenientes de curtume (descritos como FO1 e FO2), outras três fornecidas pela Associação Brasileira de Insumos para Agricultura Sustentável (INPAS) identificadas como substrato de lote:270913, condicionadores de solo de lotes: PT300712 e 2505 (descritos como FO3, FO4 e FO5) e outra amostra de lodo proveniente da estação de tratamento de água e esgoto de Jundiaí (descrito como FO6).

O material de referência certificado de solo contaminado com Cr(VI) NIST2701 (Hexavalent chromium in contaminated soil, high level -Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e o NIST 695 (elementos traços em fertilizante multinutriente) foram utilizados para o desenvolvimento do procedimento de especiação de Cr.

### ***3.3.4 Método de digestão para determinação de Cr total***

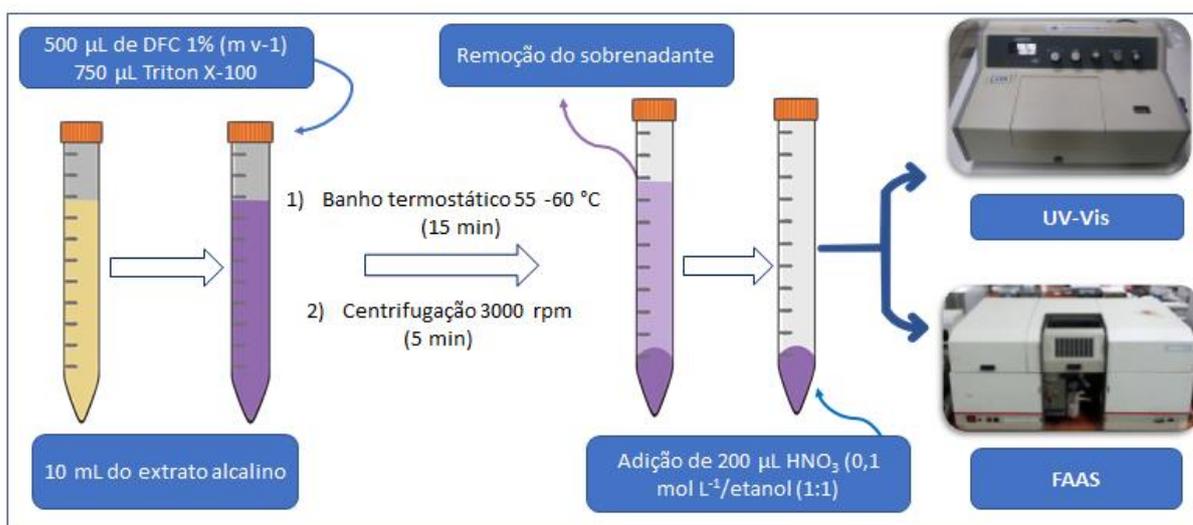
Para a digestão das amostras, 250 mg de fertilizante orgânico foram pesados diretamente em frascos de digestão de micro-ondas PFA, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> (7,0 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m m<sup>-1</sup>). O programa de aquecimento foi de (1) 15 min a 120°C, (2) 20 min até atingir 220°C e (3) 20 min a 220°C. Após a digestão, as soluções foram diluídas para 50 mL com água.

### ***3.3.5 Extração alcalina de Cr(VI)***

A extração alcalina de Cr(VI) foi baseada no método USEPA 3060A [96], com modificações. Aproximadamente 200 mg de amostra foram pesadas em erlenmeyer. Em seguida, 10 mL da solução extratora alcalina (NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> NaOH + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup>) pH ≥ 11,5, 100 mg MgCl<sub>2</sub> e 250 µL de tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> em pH 7 foram adicionados. A mistura foi agitada por pelo menos 60 min a 90-95°C. Após o resfriamento, o extrato foi transferido para um frasco cônico de 50 mL e centrifugado por 5 min a 3000 rpm.

### ***3.3.6 Extração em ponto nuvem***

O sobrenadante do extrato do item 5.3.5 foi transferido para outro frasco cônico de 50 mL contendo 1,0 g de NaCl. O pH foi ajustado para 1,5 ± 0,5 com HNO<sub>3</sub> 5,0 mol L<sup>-1</sup>, o volume ajustado para 50 mL e a solução foi centrifugada por 5 min a 3000 rpm. Volume de 10 mL do extrato foi transferido para um frasco cônico de 15 mL e, em seguida, 500 µL de DFC 1% (m v<sup>-1</sup>) e 750 µL de surfactante Triton X-100 4% (v v<sup>-1</sup>) foram adicionados. A solução foi aquecida em banho termostático a 55–60°C por 15 min e depois centrifugada por 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a fase rica em surfactante foi diluída com 200 µL de HNO<sub>3</sub>/Etanol (1:1) e levado a determinação por UV-Vis e FAAS (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Esquema do procedimento de extração em ponto nuvem (CPE)

### 3.3.7 *Análise LC-ICP-MS*

Para fins comparativos foi realizada a comparação entre o método desenvolvido, com base na EPA 3060A e o método cromatográfico ISO 17075-2:2017 (IULTCS/IUC 18-2:2017), desenvolvido para determinação de Cr(VI) em couro [208]. Esta comparação foi realizada para verificar a possibilidade de interconversão das espécies de Cr. Basicamente, no método ISO 17075-2:2017, o Cr(VI) é extraído em tampão de fosfato com pH 7,0–8,0 em temperatura ambiente. Na presente proposta, o Cr(VI) é extraído em meio alcalino (pH  $\geq$  11,5) a 90–95°C e posteriormente, o pH também é ajustado para 7,0–8,0 para preservar a coluna cromatográfica. Alíquotas dos extratos foram filtradas e analisadas por LC-ICP-MS.

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 *Otimização do método*

#### 3.4.1.1 *Método de extração alcalina*

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) descreve o procedimento 3060A para a extração de cromo hexavalente em sedimentos, solos, lodos e materiais similares, como os fertilizantes orgânicos [96]. Porém, a aplicação deste procedimento sem as devidas adequações não fornece dados satisfatórios para determinação deste analito nos fertilizantes orgânico e isto é ocasionado principalmente pela presença de compostos húmicos neste tipo de amostra. Afim de contornar estes problemas, realizou-se uma otimização dos parâmetros mais críticos de extração de Cr(VI) do procedimento 3060A.

Na análise de especiação, a oxi/redução entre as espécies deve ser evitada. Espera-se que a quantidade de Cr(VI) extraída seja proporcional à massa da amostra. No entanto, essa relação não foi observada para as amostras de fertilizantes orgânicos, conforme mostrado na Figura 4.2. A supressão do sinal de Cr (VI) ocorre com o aumento da massa da amostra. Esse fato está associado à presença de substâncias húmicas, as quais são extraídas concomitantemente, reduzindo o Cr(VI) a Cr(III). Comparando o sinal obtido para 0,2 g e 1,0 g a redução observada foi de 66% do sinal para FO1 e 100% FO2. Esses resultados enfatizam a não conformidade do procedimento 3060A para fertilizante orgânico, que recomenda o uso de 2,5 g de massa de amostra; assim, todo Cr(VI) pode ser reduzido durante a etapa de extração. Nesse sentido, como foi necessário reduzir a quantidade de amostra, também foi considerado o volume da solução de extração (NaOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para extração de Cr(VI). Foram avaliados os volumes de 10, 20 e 50 mL, e os resultados obtidos foram estatisticamente comparáveis. Com base nesses resultados, foi estabelecido um volume de 10 mL de solução extratora e 0,2 g de fertilizante orgânico para estudos posteriores.

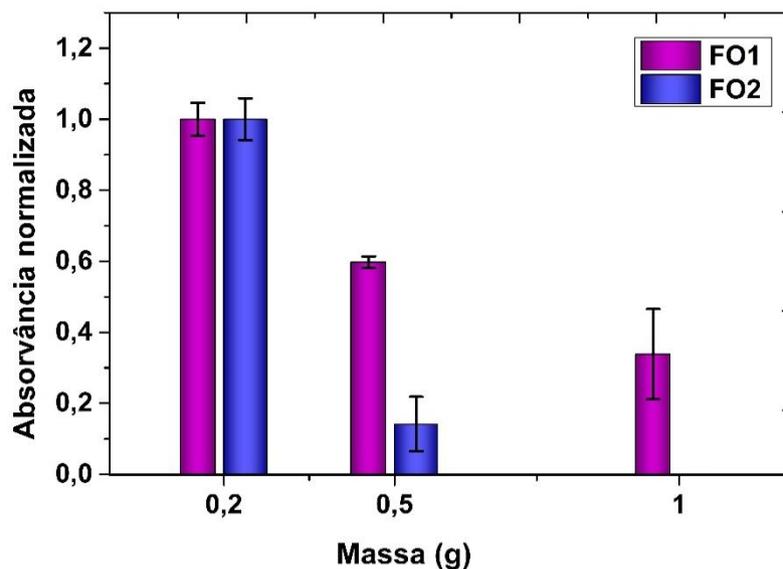
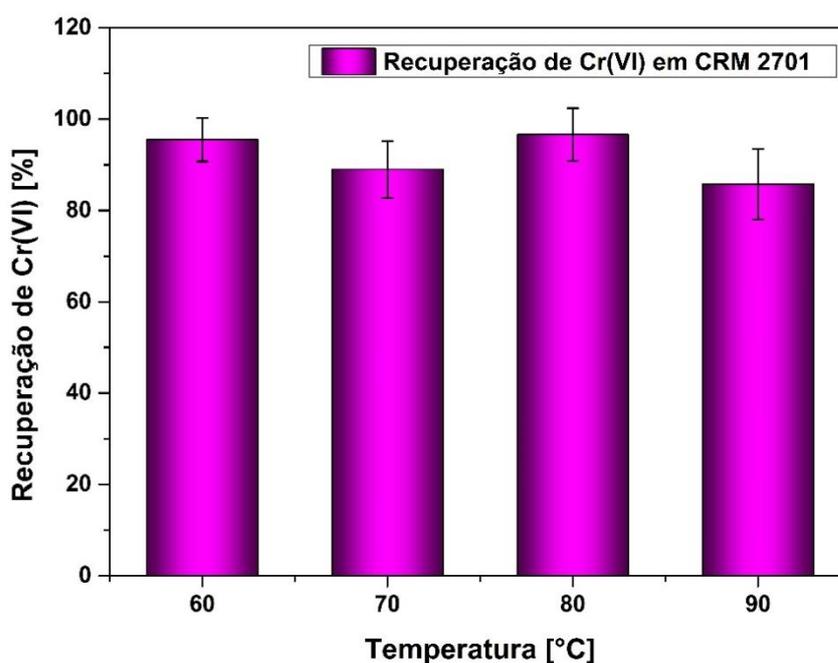
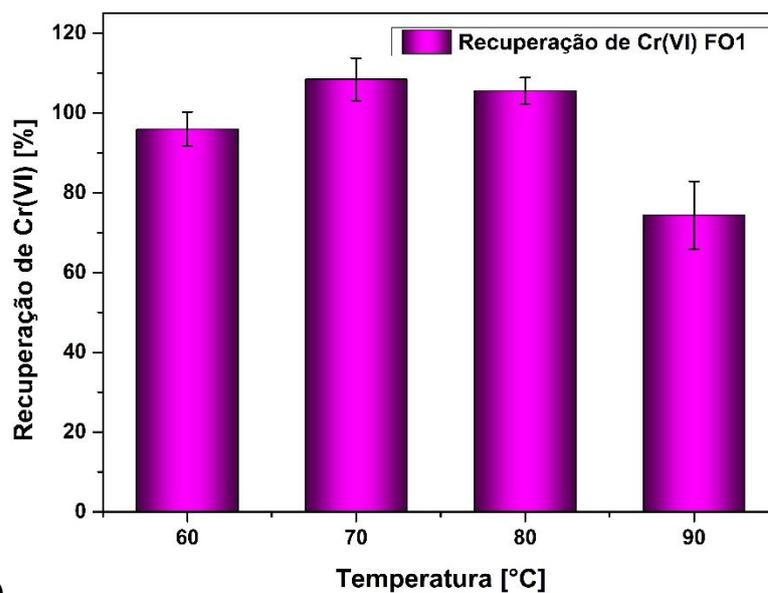


Figura 4.2 Avaliação da massa da amostra de fertilizantes orgânicos provenientes de resíduo de curtume (FO1 e FO2) na extração de Cr(VI) e determinação espectrofotométrica (n = 3).

A temperatura de extração foi estudada na faixa de 60 a 90°C para avaliar a possibilidade de oxidação do Cr (III). Quantidades de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cr(VI) foram adicionadas em amostras de fertilizante orgânico (FO1) e ao CRM (cromo hexavalente em solo contaminado, NIST 2701). As recuperações obtidas mostraram que a temperatura não é um fator crítico no processo de oxi/redução, conforme mostrado na Figura 4.3.



a)



b) **Figura 4.3** Dependência de Cr(VI) com a temperatura de (a) CRM 2701 e (b) fertilizante orgânico (n = 3)

### 3.4.1.2 Método de extração em ponto nuvem (CPE)

A determinação espectrofotométrica UV-VIS de Cr(VI) com difenilcarbazida (DFC) é sensível, simples, de fácil implementação e baixo custo [97]. O procedimento baseia-se na reação entre o Cr(VI) e a difenilcarbazida formando um complexo com coloração violeta intensa. Essa reação ocorre em meio ácido, onde o cromato é reduzido e complexado pela DFC. A reação é representada pela Equação (5.1).



A extração em ponto nuvem (CPE) foi empregada para se obter melhores limites de detecção para o UV-Vis e FAAS a fim de se ajustar aos limites estabelecidos pela EU e a IN n. 7 MAPA, as quais estabelecem limite máximo de 2 µg/g de Cr(VI) em fertilizante orgânico [21]. Para isto o método de CPE desenvolvido por Arruda e Sussulini na determinação de Cr(VI) em água foi adaptado para a matriz trabalhada [209].

Ao aplicar este procedimento às amostras, observou-se que a fase rica formada ficou na parte superior dos frascos, indicando uma possível alteração na estrutura das micelas. Um experimento foi conduzido para identificar a causa da desestabilização

micelar e estabelecer a melhor condição para extração de Cr(VI) em fertilizante orgânico. Desta forma, os possíveis fatores de desestabilização foram avaliados, como a concentração de NaCl e temperatura, que influenciam diretamente na formação das micelas. Neste estudo, um planejamento experimental de Doehlert foi aplicado (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2 Planejamento Experimental Doehlert para otimização do método de CPE**

<b>Experimento</b>	<b>NaCl (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Absorbância normalizada</b>
<b>1</b>	5 (0)	60 (0)	0,898
<b>2</b>	10 (1)	60 (0)	0,791
<b>3</b>	7,5 (0,5)	70(0,866)	0,811
<b>4</b>	0 (-1)	60 (0)	1,000
<b>5</b>	2,5 (-0,5)	50 (-0,866)	0,954
<b>6</b>	7,5 (0,5)	50 (-0,866)	0,855
<b>7</b>	2,5 (-0,5)	70 (0,866)	0,878
<b>8</b>	5 (0)	60 (0)	0,956
<b>9</b>	5 (0)	60 (0)	0,969

O estudo desenvolvido ajudou a identificar a causa da desestabilização das micelas e estabelecer a melhor condição para extração de Cr(VI) em fertilizante orgânico. Nas concentrações acima de 8% de NaCl, há uma redução significativa do sinal analítico, evidenciada pela alteração das micelas. Já a temperatura não interferiu na formação das micelas na faixa estudada. Esta adaptação do método foi indispensável devido a diferença de matriz, água e fertilizante orgânico, pois no preparo da amostra de fertilizante orgânico já é adicionada uma grande quantidade de sais, sendo assim necessário somente a aplicação de 2% de NaCl nas amostras para estabilização das micelas e temperatura de 55 – 60°C, como mostrado na Figura 4.4.

Nos extratos os compostos húmicos presentes nas amostras de fertilizantes apresentam coloração escura. Em meio ácido esta fração mais pesada precipita e pode ser separada por uma simples centrifugação. A solução resultante é amarela pálida, característica da fração mais leve, os ácidos fúlvicos. Este meio é sensível a presença da difenilcarbazida, tornando a solução violeta intensa caso haja a presença de Cr(VI) na amostra analisada, mesmo em baixas concentrações. O ácido fúlvico absorve

radiação em 545 nm, no entanto é possível detectar o Cr(VI) no meio, sendo para isso necessário que se aplique o procedimento de CPE na presença e ausência do complexante difenilcarbazida. A diferença entre as absorbâncias é relativa ao Cr(VI) presente na amostra. Desta forma é possível se obter resultados livres de interferências na determinação de Cr(VI) por UV-VIS em fertilizantes orgânicos. Na determinação de Cr(VI) com CPE por FAAS esse tipo de correção não é requerida.

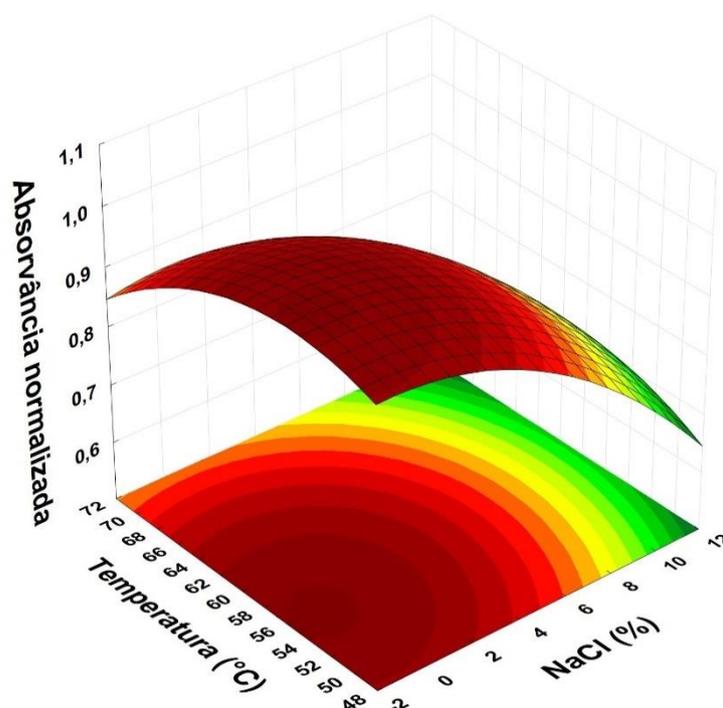


Figura 4.4 Superfície de resposta do planejamento Doehlert para temperatura *versus* NaCl no método de CPE

### 3.4.2 Parâmetros analíticos

Sob as condições otimizadas foram avaliados os parâmetros analíticos e determinados de acordo as recomendações União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) [130]. O limite de detecção foi definido como  $LOD = 3s/S$  (onde  $s$  é o desvio padrão obtido do sinal de branco e  $S$  é a da curva de calibração). O limite de quantificação (LOQ) foi determinado a partir da razão de dez vezes o desvio padrão do branco pela inclinação da curva de calibração. Já o fator de enriquecimento foi determinado pela divisão entre as inclinações das curvas de calibração com pré-

concentração e sem pré-concentração. A precisão do procedimento foi estimada pelo desvio padrão relativo de 10 medidas na menor e maior concentração da curva de calibração, sendo estes valores menores que 7,0 %. Os valores obtidos estão resumidos na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3 Resumo dos parâmetros analíticos obtidos para o método de CPE de Cr(VI)**

Parâmetros	UV-VIS	FAAS
Curva de calibração	Absorbância = $0,0041 \pm 0,0006$ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] - $0,019 \pm 0,102$	Absorbância = $0,0010 \pm 0,0001$ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] + $0,059 \pm 0,002$
LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,41	0,55
LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1,38	1,82
Faixa de trabalho	1,5 – 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,85 – 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Fator de enriquecimento	5	10
Precisão	5,5 %	7,0 %

### 3.4.3 Interferência e efeito de matriz

Alguns íons são descritos na literatura como potencial interferentes na determinação de Cr(VI) pelo método da difenilcarbazida. Neste estudo, diferentes concentrações de Hg, Mo, Fe, V, Ni, Cd, Pb, Mn e Co foram adicionados a soluções contendo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cr(VI) e nas amostras submetidas ao método de CPE. Os resultados mostraram que as recuperações foram quantitativas para o Cr(VI) na presença de outros íons (Tabela 4.4). Outros íons, como metais alcalinos e metais alcalino-terrosos e ânions foram comprovados anteriormente como não interferentes [206,207]. Além disso, íons como Na(I), Mg(II) e fosfato foram usados durante a etapa de extração. Os resultados obtidos indicam que o método pode ser aplicado para determinar Cr(VI) em amostras de fertilizantes orgânicos.

**Tabela 4.4 Estudos da interferência de alguns íons na determinação de Cr(VI)**

Íons	Proporção	% Recuperação (UV-VIS)	% Recuperação (FAAS)
Hg	1:100	102	115
Mo	1:100	99	91
Fe	1:100	92	97
V	1:100	97	84
Ni <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	1:50	99	99

As determinações foram realizadas alternativamente por FAAS. Neste método, o efeito da matriz foi avaliado por curvas de calibração para Cr(VI) por calibração externa com 2%, 5%, 7% e 10% NaCl (m v<sup>-1</sup>), e calibração com adição de padrão usando extratos preparados das amostras de fertilizantes. Ambos os procedimentos foram submetidos ao método CPE previamente descrito, com concentrações variando de 20 a 500 µg L<sup>-1</sup> Cr (VI). Não foram encontradas diferenças significativas entre as inclinações da curva de calibração externa com 7% (m v<sup>-1</sup>) NaCl e a curva com compatibilização de matriz, que foi considerada semelhante e não teve efeito crítico da matriz. Portanto, as determinações de Cr(VI) podem ser realizadas por calibração externa.

#### **3.4.4 Validação do método**

A veracidade do método de CPE para a determinação de Cr(VI) foi avaliada a partir da análise dos CRMs cromo hexavalente em solo contaminado (NIST 2701) e Elementos Traço em Fertilizante Multi-Nutriente (NIST 695), e análise de adição e recuperação nas amostras.

O teste t de Student foi aplicado para comparar os valores certificados e os valores obtidos. Não houve diferença significativa, uma vez que os valores de t calculados 3,94, 0,45 e 0,66 obtidos de CPE-FAAS, CPE-UV-VIS e FAAS foram inferiores ao valor t crítico (4,3) na análise de Cr(VI) e Cr total. Recuperações de 94 a 101% foram obtidas para Cr total e Cr(VI) por FAAS e UV-VIS nos CRMs, como pode ser observado na Tabela 4.5. Na análise das amostras com adição de padrão, 500 µg L<sup>-1</sup> Cr(VI) foi adicionado às amostras de fertilizante orgânico e o

procedimento de extração alcalina foi empregado. Valores de recuperação de 82 a 90% foram obtidos para FO1, FO2, FO4 e FO5. No entanto, para amostras de FO3 e FO6, recuperações quantitativas não foram obtidas, provavelmente devido aos altos teores de compostos húmicos nessas amostras, que reduziram a Cr(VI), mesmo utilizando uma pequena quantidade de amostra. Resultados semelhantes foram observados por Krüger e colaboradores ao analisar fertilizantes orgânicos de cinzas de lodo de esgoto [210].

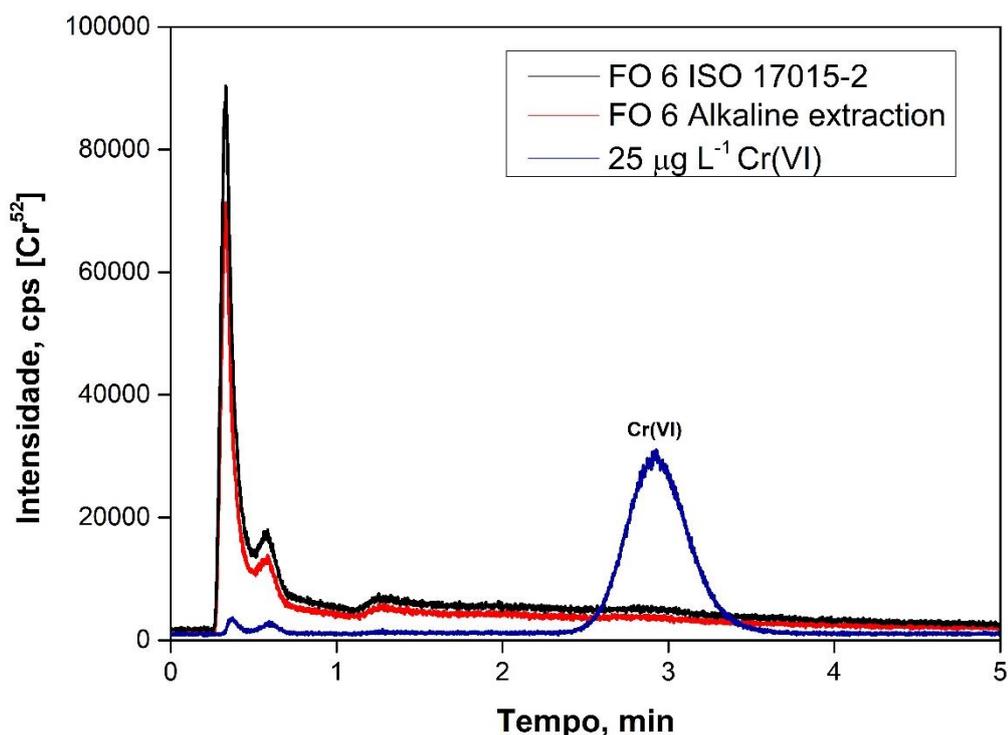
**Tabela 4.5 Avaliação da exatidão do método CPE-Cr(VI) por UV-Vis e FAAS nos CRMs (NIST 2701) e (NIST 695) por FAAS, resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ) e as recuperações (%)**

CRM	Valor certificado		Valor encontrado		
	Cr Total	Cr(VI)	Cr Total <sup>a</sup>	Cr(VI) <sup>b</sup>	Cr(VI) <sup>c</sup>
<b>2701</b>	-	551,2 $\pm$ 34,5	-	530,90 $\pm$ 6,97 (96)	559,15 $\pm$ 31,28 (101)
<b>695</b>	244 $\pm$ 6	-	230,0 $\pm$ 13,1 (94)	-	-

Determinação por: <sup>a</sup>FAAS; <sup>b</sup>CPE-FAAS; <sup>c</sup>CPE-UV-VIS.

### **3.4.5 Método comparativo LC-ICP-MS**

A comparação entre o método desenvolvido, com extração em  $\text{pH} \geq 11,5$  a 90–95°C e o método cromatográfico ISO 17075-2:2017 [208], extração em  $\text{pH} 7,0\text{--}8,0$  e temperatura ambiente é apresentada na Figura 4.5. É possível observar a não ocorrência de oxi/redução durante os procedimentos de extração.



**Figura 4.5** Amostra de extrato de cromo de fertilizante orgânico (FO6) com (-) ISO 1701-2 e (-) extração alcalina e (-) padrão  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  Cr(VI) por LC-ICP-MS

As incertezas das medidas de Cr(VI) em CRM (NIST 2701) usando o método desenvolvido e o método cromatográfico ISO 17075-2:2017 foram avaliadas seguindo o Guia para a Expressão de Incerteza na Medição (2008), nota técnica NIST 1297 [211], e similarmente ao esquema apresentado por Lesniewska et al. (2016) [212]. Os parâmetros incluídos na equação do modelo foram identificados como componentes que contribuem significativamente para os resultados da medição. Com base em suas próprias incertezas padrão e na propagação da incerteza, a incerteza padrão combinada da concentração de analito na fração do CRM,  $u(\text{CCr(VI)})$ , foi avaliada de acordo com a Equação 4.2:

$$\frac{u_{c(\text{Cr(VI)})}}{c(\text{Cr(VI)})} = \sqrt{u\left(\frac{ma}{ma}\right)^2 + u\left(\frac{ve}{ve}\right)^2 + u\left(\frac{cal}{cal}\right)^2 + u\left(\frac{R}{R}\right)^2 + u\left(\frac{f}{f}\right)^2 + u(\text{repeat}_{ext.})} \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde  $u(\text{ma})$ ,  $u(\text{ve})$ ,  $u(\text{cal})$ ,  $u(\text{R})$ ,  $u(\text{f})$  e  $u(\text{repeat}_{ext.})$  denotam incertezas padrão de massa de amostra, volume de extrato, calibração, recuperação, fator de diluição e repetibilidade do processo de extração, respectivamente. A incerteza expandida obtida ( $U$ ) das medições do conteúdo de Cr(VI) no CRM (NIST 2701, valor de referência de  $551,2 \pm 34,5 \mu\text{g g}^{-1}$  Cr(VI)), foi  $535,7 \pm 40,3 \mu\text{g g}^{-1}$  Cr(VI);  $U = 8,5\%$

(k = 2) no extrato da solução com a ISO 17075–2:2017 (pH 7,0–8,0, em temperatura ambiente). Por outro lado, a incerteza expandida obtida com o método desenvolvido (pH  $\geq$  11,5; 90–95 °C) foi  $540,2 \pm 33,6 \mu\text{g g}^{-1} \text{Cr(VI)}$ ; U = 7,6% (k = 2). Esses resultados não se apresentam estatisticamente diferentes (Tukey, p > 0,05).

### 3.4.6 Cr(VI) em fertilizante orgânico

As frações de massa obtidas de Cr total e Cr(VI) nos fertilizantes orgânicos são apresentadas na Tabela 4.6. Nas amostras FO1 e FO2, a quantidade de Cr(VI) foi superior ao máximo permitido pelo MAPA,  $2 \mu\text{g g}^{-1} \text{Cr(VI)}$ , indicando que esses materiais não podem ser usados como fertilizante orgânico. Como os valores obtidos para essas amostras estão acima de  $19 \mu\text{g g}^{-1}$ , o LOQ para FAAS, foi realizada a determinação direta no extrato alcalino, sem a etapa de pré-concentração. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com o método de CPE. Nas demais amostras orgânicas avaliadas, a fração de massa de Cr(VI) ficou abaixo do LOD do método desenvolvido.

**Tabela 4.6** Aplicação do método separação e pré-concentração desenvolvido para determinação de Cr total e Cr(VI) em amostras de fertilizantes orgânicos pelo método de (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)

Amostra	Cr Total <sup>a</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Cr(VI) <sup>b</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Cr(VI) <sup>c</sup> mg kg <sup>-1</sup>
FO1	20146,0 $\pm$ 1275,2	346,34 $\pm$ 35,01	403,45 $\pm$ 38,76
FO2	28928,3 $\pm$ 799,2	1000,66 $\pm$ 68,76	939,68 $\pm$ 76,74
FO3	378,9 $\pm$ 10,8	<1,82	<1,38
FO4	73,3 $\pm$ 1,6	<1,82	<1,38
FO5	41,8 $\pm$ 2,1	<1,82	<1,38
FO6	162,1 $\pm$ 1,5	<1,82	<1,38

Determinação por: <sup>a</sup>FAAS; <sup>b</sup>CPE-FAAS; <sup>c</sup>CPE-UV–VIS.

### 3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Um método baseado em extração alcalina seguida por CPE para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico foi otimizado por planejamento experimental Doehlert. Com as condições de extração definidas, as limitações relacionadas à presença de compostos húmicos para a maioria das amostras foram superadas, proporcionando resultados precisos e exatos. Um estudo comparativo por LC-ICP-MS com diferente procedimento de extração foi realizado para avaliar a possibilidade de interconversão de espécies de Cr. Não foi observada diferença significativa, confirmando que o método é adequado para a determinação de Cr(VI) em fertilizantes orgânicos. A minimização de reagentes, excelente eficiência de extração e instrumentos de análise de baixo custo foram as principais características do método, que pode utilizar a espectrofotometria UV-VIS ou a FAAS para a detecção dos teores de cromo. Além disso, foi desenvolvido método analítico adequado para dar suporte à legislações brasileira e europeia. Alguns tipos de compostos orgânicos ainda apresentaram interferência devido à alta concentração de compostos húmicos. Isto implica que procedimentos com melhor eficiência de extração precisam ser desenvolvidos. Assim menores quantidades de amostras podem ser analisadas, apresentando menos interferência sem a perda da sensibilidade.

## CONCLUSÕES FINAIS

Dos estudos desenvolvidos ao longo dessa tese os pontos descritos a seguir merecem destaque

Foram avaliados métodos de pré-concentração que possibilitaram o aumento da sensibilidade do MIP OES. Dentre os métodos avaliados, o método de separação e pré-concentração baseado na extração em fase sólida dos analitos As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn em amostras de carnes e peixes e determinados por MIP OES apresentou-se adequado. Os LOD, apesar de baixos se mostraram ainda superiores aos limites máximos permitidos pela legislação para alguns dos analitos, como As e Hg, havendo a necessidade de serem determinados por técnicas de geração de hidretos, no caso do As, ou vapor frio, no caso do Hg, para adequação aos teores exigidos pela legislação, ou mesmo o emprego de outra técnica de pré-concentração, como demonstrado a seguir. O método representa uma alternativa econômica para a determinação de elementos traço quando comparado a técnicas instrumentais de alto custo como ICP OES e ICP-MS.

Outra técnica explorada para separação/pré-concentração e que se mostrou eficiente para aumentar a sensibilidade do MIP OES se baseou na coprecipitação, que foi aplicada para a determinação de As e Cd em amostras de peixes. A combinação coprecipitação e MIP OES forneceu um procedimento com exatidão satisfatória e sensibilidade adequada compatíveis aos valores estabelecidos pela legislação.

A combinação LC-ICP-MS foi empregada no método desenvolvido para especiação de As em amostras de peixes, camarões e molusco bivalve, otimizado para cada matriz individualmente, considerando as suas particularidades e possíveis interferências na técnica de determinação. A aplicação da extração empregando 30 mmol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> como solução extratora, em 40 min a 90°C permitiu extrair as espécies de As, determinadas com resolução adequada e um tempo curto. O método proposto apresentou bons parâmetros analíticos, caracterizado por sua ótima sensibilidade, linearidade e seletividade. Segundo a legislação brasileira para pescados todas as amostras apresentaram resultados superiores ao limite máximo permitido. No entanto, como esperado a AsB foi a espécie química principal presente nas amostras de pescado, salientando a necessidade de ser incluída na legislação

parâmetros relacionados à espécie química. Método para a análise de especiação de Cr(VI) e Cr(III) solúvel em amostras de peixes, molusco, camarões e solo por LC-ICP-MS foi desenvolvido, sendo que os resultados apresentaram resolução cromatográfica adequada, com ótima sensibilidade, linearidade e boa seletividade. A espécie presente nas amostras foi o Cr(III), como previsto em amostras alimentícias.

E por fim, método baseado em extração alcalina seguida por CPE para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico com detecção por espectrofotometria UV-VIS ou FAAS. Limitações relacionadas à presença de substâncias húmicas, que provocavam a redução do Cr(VI) no meio extrator foram contornadas com sucesso, proporcionando resultados precisos e exatos. Estudo comparativo empregando LC-ICP-MS mostrou não haver interconversão das espécies de Cr nas condições estabelecidas. O método se mostrou é adequado para dar suporte às legislações brasileira e europeia referente à determinação de Cr(VI) em fertilizantes orgânicos.

## REFERÊNCIAS

- [1] UNITED NATIONS. DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS POPULATION DYNAMICS. World Population Prospects 2020.
- [2] XIMENES, L. F. PRODUÇÃO DE PESCADO NO BRASIL E NO NORDESTE BRASILEIRO. Caderno Setorial ETENE, v. 5, n. 150, p. 1–16, 2021.
- [3] CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Panomara Agro. 2020.
- [4] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the Sustainable Development Goals. Roma, Itália: FAO, 2018.
- [5] SINGH, R. Organic Fertilizers: Types, Production and Environmental Impact. Nova Science Inc., New York, 2012.
- [6] THILSTED, S. H. et al. Maximizing the contribution of fish to human nutrition. ICN2 Second International Conference on Nutrition: better nutrition better lives. Anais FAO e World Health Organization, 2014.
- [7] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 487, Instrução Normativa n. 88 de 26 de março de 2021. Dispõe sobre os Limites Máximos Toleráveis (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para seu estabelecimento e os métodos de análise para avaliação de sua conformidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Edição 61, Seção 1, pag. 225, publicado dia 31 de março de 2021.
- [8] WILLIAMS, C. B. et al. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 116, p. 151–157, 2019.
- [9] MOREIRA, L. S. et al. Coprecipitation magnesium(II) hydroxide as a strategy of pre-concentration for trace elemental determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, v. 169, p. 105899, 2020.
- [10] SILVA, A. B. S. et al. Feasibility of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Molybdenum Determination in Lamb Meat by MIP OES. Food Analytical Methods, v. 14, n. 3, p. 496–502, 2021.
- [11] SÁ, I. P. DE et al. Determination of Trace Elements in Meat and Fish Samples by MIP OES Using Solid-Phase Extraction. Food Analytical Methods, v. 13, n. 1, p. 238–248, 2020.
- [12] MEERMANN, B.; NISCHWITZ, V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review. J. Anal. At. Spectrom., v. 33, n. 9, p. 1432–1468, 2018.
- [13] KHAN, N. et al. Determination of toxic heavy metals and speciation of arsenic in seaweeds from South Korea. Food Chemistry, v. 169, p. 464–470, 2015.
- [14] DUARTE, F. A. et al. Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation. J. Anal. At. Spectrom., v. 24, n. 2, p. 224–227, 2009.
- [15] SUN, C. et al. Determination of trace elements in samples with high salt content by inductively coupled plasma mass spectrometry after solid-phase preconcentration. International Journal of Mass Spectrometry, v. 431, p. 22–26, 2018.
- [16] TEMPLETON, D. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and

fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72 (2000), v. 72, 2000.

[17] AGUIAR, G. P. S.; GOULART, G. A. S. Utilização de material residual da indústria de pescado para obtenção de óleo e farinha. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 7, p. 55–60, 2013.

[18] MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portal do em Agronegócio. Brasil, 2015.

[19] OECD – FAO. *Environmental Outlook to 2050: The consequences of inaction*, Paris, 2012.

[20] ANDA – Associação Nacional para a Difusão de Adubos. Mercado de fertilizantes - .In: Principais indicadores do setor de fertilizantes: Brasil, 2021. Disponível em < [https://anda.org.br/pesquisa\\_setorial/](https://anda.org.br/pesquisa_setorial/)>. 28/09/21.

[21] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. IN n. 7 de 12 de abril de 2016. *Diário Oficial da União*. Brasil., 2016.

[22] MÜLLER, A.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L. Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: a review. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 35, n. 10, p. 2113–2131, 2020.

[23] SERRANO, R. et al. Evaluation of calcium-, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: comparison with ICP-OES. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 34, n. 8, p. 1611–1617, 2019.

[24] GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 31, n. 5, p. 1097–1104, 2016.

[25] LI, W. et al. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, v. 112, p. 43–48, Aug. 2013.

[26] NIEDZIELSKI, P. et al. Microwave induced plasma optical emission spectrometry in agricultural analysis. *Plant Soil Environ.*, v. 62, n. 5, p. 215–221, 2016.

[27] POZEBON, D.; MÜLLER, A.; RIBEIRO, A. Methodology for elemental analysis of mineral fertilizer, some of its raw materials and limestone using microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). *Analytical Methods*, v. 12, 16 Apr. 2020.

[28] LIMA, A. et al. Fast ultrasound-assisted treatment of inorganic fertilizers for mercury determination by atomic absorption spectrometry and microwave-induced plasma spectrometry with the aid of the cold-vapor technique. *Microchemical Journal*, v. 118, p. 40–44, 2015.

[29] SANDY ARAÚJO SILVA et al. Determinação de metais em peixes e camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) do estuário da Lagoa dos Patos (Pelotas-RS, Brasil) por MIP OES. *Braz. J. Food Technol.*, v. 22, 2019.

[30] LOWERY, K. L. et al. Signal correction using molecular species to improve biodiesel analysis by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 129, p. 58–62, 2016.

[31] CARTER, J. A. et al. Traditional calibration methods in atomic spectrometry and new calibration strategies for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Frontiers in chemistry*, v. 6, p. 504, 13 Nov. 2018.

- [32] PIRES, L. N.; S DIAS, F. DE; TEIXEIRA, L. S. G. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 1090, p. 31–38, 2019.
- [33] MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se and Sn by microwave induced plasma spectrometry using a quadruple-mode microflow ultrasonic nebulizer for in situ hydride generation with internal standardization. *Microchemical Journal*, v. 131, p. 70–78, 2017.
- [34] OLIVEIRA, A. F.; GONZALEZ, M. H.; NOGUEIRA, A. R. A. Use of multiple lines for improving accuracy, minimizing systematic errors from spectral interferences, and reducing matrix effects in MIP OES measurements. *Microchemical Journal*, v. 143, p. 326–330, 2018.
- [35] ALTHOFF, A. G. et al. Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES) and Standard Dilution Analysis to Determine Trace Elements in Pharmaceutical Samples. *Applied spectroscopy*, v. 71, n. 12, p. 2692–2698, 2017.
- [36] BEZERRA, M. D. A. FERREIRA, S. L. C. Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica. Vitória da Conquista: Edições UESB, 2006.
- [37] AYALA, A.; TAKAGAI, Y. On-line pseudo-stationary magnetic solid-phase extraction using magnetic cation exchange microparticles and its application to the determination of strontium. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 33, n. 7, p. 1251–1255, 2018.
- [38] AYALA, A.; TAKAGAI, Y. Sequential Injection Analysis System Exploiting On-line Solid-phase Extraction for the Determination of Strontium and Nickel by Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Analytical Sciences*, v. 34, n. 3, p. 387–390, 2018.
- [39] ZHANG, J. et al. On-line preconcentration/separation of inorganic arsenic and antimony by poly (aryl ether ketone) containing pendant carboxyl groups prior to microwave plasma atomic spectrometry determinations. *Microchemical Journal*, v. 100, p. 95–99, 2012.
- [40] AHMAD, H.; JALIL, A. A.; TRIWAHYONO, S. Dispersive solid phase extraction of gold with magnetite-graphene oxide prior to its determination via microwave plasma-atomic emission spectrometry. *RSC Adv.*, v. 6, n. 91, p. 88110–88116, 2016.
- [41] SÁ, I. P. et al. Pré-Concentração Baseada na Coprecipitação usando Cromato de Prata como Carreador para Determinação de Cobre por FAAS. *Química Nova*, v. 42, n. 1, p. 10–16, 2019.
- [42] PALEOLOGOS, E. K. Micelle-mediated methodology for speciation of chromium by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 15, n. 287–291, 2000.
- [43] PALEOLOGOS, E. K. STALIKAS, C. D.; KARAYANNI, M. I. An optimized single-reagent method for the speciation of chromium by flame atomic absorption spectrometry based on surfactant micelle-mediated methodology. *Analyst*, v. 126, p. 289–293, 2001.
- [44] ZHU, X. S. Cloud point extraction for speciation of chromium by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 25, p. 170–176, 2004.
- [45] SHEMIRANI, F.; BAGHDADIA, M.; RAMEZANIB, M. Pre-concentration and determination of ultra trace amounts of arsenic (III) and arsenic (V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 65, p. 882887, 2005.

- [46] TANG, A. Cloud point extraction for high-performance liquid chromatographic speciation of Cr(III) and Cr(VI) in aqueous solutions. *Journal of Chromatography A*, v. 1036, p. 183–188, 2004.
- [47] SHENPING, W.; ZHU, X. Speciation of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) by a facile dual-cloud point extraction coupled with inductively plasma-optical emission spectrometry. *Talanta*, v. 181, p. 265–270, 2018.
- [48] LIANG, P.; SANG, H. Speciation of chromium in water samples with cloud point extraction separation and preconcentration and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J Hazard Mater*, v. 154, p. 1115–1119, 2008.
- [49] KIRAN., K.; KUMAR, S. K.; PRASAD, B; LEKKALA, R. B.; JANARDHANAM, K. Speciation determination of chromium(III) and (VI) using preconcentration cloud point extraction with flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *J Hazard Mater*, v. 150, p. 582–585, 2008.
- [50] MEI, S.; QIANGHUA, W. Cloud point extraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for speciation of Cr(III) in human serum samples. *J Pharm Biomed Anal.*, v. 60, p. 14–18, 2012.
- [51] THOMAS, R. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. [s.l.] Boca Raton: CRC Press, 2013.
- [52] SOUZA RAMOS, B. DE et al. Exposure to toxic and essential trace elements through the intake of processed and meat cuts (beef and chicken) in southeastern Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, v. 191, n. 8, p. 477, Jul. 2019.
- [53] LUM, T.-S.; SZE-YIN LEUNG, K. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 31, n. 5, p. 1078–1088, 2016.
- [54] MACHADO, R. C. et al. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 23, p. 4839–4842, 14 Jun. 2017.
- [55] BALCAEN, L. et al. Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, v. 894, p. 7–19, 2015.
- [56] ALIAGA-CAMPUZANO, M. P. et al. Direct analysis of lanthanides by ICPMS in calcium-rich water samples using a modular high-efficiency sample introduction system–membrane desolvator. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 28, n. 7, p. 1102–1109, 2013.
- [57] YAMADA, N. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 110, p. 31–44, 2015.
- [58] AMARAL, C. D. B. et al. Determination of rare earth elements in geological samples using the Agilent SVDV ICP-OES. p. 1–6, 2015.
- [59] CHERVIAKOUSKI, K. A New Method of Mathematical Correction of the Results of Analysis, Obtained by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Ensuring the Elimination of the Interference of Doubly Charged Ions. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 72, p. 1434–1440, 2017.

- [60] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Unicamp, 2006.
- [61] CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001.
- [62] RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of chromatography. A*, v. 1156, n. 1–2, p. 201–205, 2007.
- [63] ZOCCOLO, G. J. Princípios e aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Araraquara: Conselho Regional de Química-IV Região (SP). 106 p. 2012.
- [64] CHEN, Y. et al. Modification of risk of arsenic-induced skin lesions by sunlight exposure, smoking, and occupational exposures in Bangladesh. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, v. 17, n. 4, p. 459–467, 2006.
- [65] BATISTA, B. L. et al. Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. v. 29, n. 5, p. 780–788, 2012.
- [66] SCHMIDT, L. et al. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 255, p. 340–347, 2018.
- [67] VACCHINA, V.; LA CALLE, I. DE; SÉBY, F. Cr(VI) speciation in foods by HPLC-ICP-MS: investigation of Cr(VI)/food interactions by size exclusion and Cr(VI) determination and stability by ion-exchange on-line separations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 407, n. 13, p. 3831–3839, 2015.
- [68] SÉBY, F.; VACCHINA, V. Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental, industrial and food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018.
- [69] FELDMANN, J.; KRUPP, E. M. Critical review or scientific opinion paper: arsenosugars--a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 399, n. 5, p. 1735–1741, 2011.
- [70] VACCHINA, V.; S, F. Trends in Analytical Chemistry Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental , industrial and food matrices. 2017.
- [71] UNCETA, N. et al. Chromium speciation in solid matrices and regulation : a review. p. 1097–1111, 2010.
- [72] MARKIEWICZ, B. et al. Talanta Chromium and its speciation in water samples by HPLC / ICP-MS – technique establishing metrological traceability : A review since 2000. v. 132, p. 814–828, 2015.
- [73] MARCINKOWSKA, M.; BARAŁKIEWICZ, D. Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique - HPLC/ICP-MS: A review. *Talanta*, v. 161, p. 177–204, 2016.
- [74] TEMPLETON, D. M.; FUJISHIRO, H. Terminology of elemental speciation – An IUPAC perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 352, p. 424–431, 2017.
- [75] OLIVEIRA, A. et al. DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A SELENIUM SPECIATION METHOD IN CATTLE FEED AND BEEF SAMPLES USING HPLC-ICP-MS: EVALUATING SELENIUM METABOLIC PROCESS IN CATTLE. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 31, 1, 2016.

- [76] LÓPEZ, D. L. et al. Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America. *The Science of the total environment*, v. 429, p. 57–75, 2012.
- [77] MESTROT, A. et al. Field Fluxes and Speciation of Arsines Emanating from Soils. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 5, p. 1798–1804, 2011.
- [78] CASADO, M. et al. Arsenic bioavailability in polluted mining soils and uptake by tolerant plants (El Cabaco mine, Spain). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 79, n. 1, p. 29–35, 2007.
- [79] JIAO, W. et al. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. *Environmental Pollution*, v. 168, p. 44–53, 2012.
- [80] MAHZUZ, H. et al. Use of arsenic contaminated sludge in making ornamental bricks. *International Journal of Environment Science and Technology*, Vol 6 Num 2, v. 6, 2009.
- [81] ALI, W. et al. Arsenite transport in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 66, n. 14, p. 2329–2339, 2009.
- [82] SCHMIDT, A. C. et al. Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials. *Journal of chromatography. A*, v. 889, n. 1–2, p. 83–91, 2000.
- [83] NARUKAWA, T. et al. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, v. 77, n. 1, p. 427–432, 2008.
- [84] GENG, W. et al. Arsenic speciation in marine product samples: comparison of extraction-HPLC method and digestion-cryogenic trap method. *Talanta*, v. 79, n. 2, p. 369–375, 2009.
- [85] TUZEN, M. et al. Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 48, n. 1, p. 41–46, 2010.
- [86] FRANCESCONI, K. A. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry*, v. 82, n. 2, p. 373–381, 2010.
- [87] EFSA. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *Journal EFSA*, v. 7, n. 10, p. 199, 2009.
- [88] TACON, A. G. J.; METIAN, M. Food Matters: Fish, Income, and Food Supply—A Comparative Analysis. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v. 26, n. 1, p. 15–28, 2018.
- [89] PÉTURSDÓTTIR, Á. H. et al. Inorganic arsenic in seafood : Does the extraction method matter ? v. 150, p. 353–359, 2014.
- [90] EASTMOND, D. A.; MACGREGOR, J. T.; SLESINSKI, R. S. Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical reviews in toxicology*, v. 38, n. 3, p. 173–190, 2008.
- [91] HANSEN, M. B.; JOHANSEN, J. D.; MENNÉ, T. Chromium allergy: significance of both Cr(III) and Cr(VI). *Contact dermatitis*, v. 49, n. 4, p. 206–212, 2003.
- [92] EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. *Journal EFSA*, v. 12, n. 10, p. 25, 2014.
- [93] IARC (1990) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 49. Chromium, Nickel and Welding, International Agency for Cancer Research, Lyon.

- [94] USEPA (1998) Toxicological Review of Hexavalent Chromium. U.S. Government Printing Office, Washington.
- [95] BIELICKA-GIEŁDOŃ, A.; BOJANOWSKA, I.; WIŚNIEWSKI, A. Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 14, 2005.
- [96] USEPA. Official Methods of Analysis. United States Environmental Protection Agency, Method 3060A, in: Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium.
- [97] USEPA. Official Methods of Analysis (1992) United States Environmental Protection Agency, Method 7196A, in: Chromium Hexavalent (Colorimetric), 1992.
- [98] PETTINE, M.; CAPRI, S. Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 540, n. 2, p. 231–238, 2005.
- [99] NEFF, J. M. Bioaccumulation in Marine Organisms. Elsevier, 2002.
- [100] COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1ª edição ed. Barueri, SP: Manole, 2005.
- [101] SCHWARZ, K.; MERTZ, W. Cr(III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 85, p. 292–295, 1959.
- [102] LIANG, G. et al. Analysis of Heavy Metals in Foodstuffs and an Assessment of the Health Risks to the General Public via Consumption in Beijing, China *International Journal of Environmental Research and Public Health* , 2019.
- [103] RATHER, I. A. et al. The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 830, 2017.
- [104] SAHA, N. et al. Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for human health risk assessment. *Food Control*, v. 70, p. 110–118, 2016.
- [105] BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4. ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [106] ANDRADE KORN, M. DAS G. et al. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 2, p. 67–92, 2008.
- [107] EVANS, E. H. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 28, p. 779–800, 2013.
- [108] HYWEL EVANS, E. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 30, p. 1017–1037, 2015.
- [109] GALLEGO RÍOS, S. E.; PEÑUELA, G. A.; RAMÍREZ BOTERO, C. M. Method Validation for the Determination of Mercury, Cadmium, Lead, Arsenic, Copper, Iron, and Zinc in Fish Through Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES). *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 10, p. 3407–3414, 2017.
- [110] CHEN, S. et al. Dispersive micro-solid phase extraction using magnetic ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanotubes as adsorbent for preconcentration of Co(II), Ni(II), Mn(II) and Cd(II) followed by ICP-MS determination. *Microchemical Journal*, v. 147, p. 232–238, 2019.

- [111] CHEN, X.-L. et al. Rapid Determination of Sulfonamides in Chicken Muscle and Milk Using Efficient Graphene Oxide-Based Monolith On-Line Solid-Phase Extraction Coupled with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, v. 12, n. 1, p. 271–281, 2019.
- [112] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. *Métodos de Preparo de Amostra para Análise Elementar*. 2ª ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.
- [113] HU, B.; HE, M.; CHEN, B. Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, n. 10, p. 2685–2710, 2015.
- [114] CALDERILLA, C. et al. Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 108, p. 370–380, 2018.
- [115] COSTA, J. A. S. et al. Photoluminescent properties of the europium and terbium complexes covalently bonded to functionalized mesoporous material PABA-MCM-41. *Journal of Luminescence*, v. 192, p. 1149–1156, 2017.
- [116] MEIRA, L. A.; SOUZA DIAS, F. DE. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. *Microchemical Journal*, v. 130, p. 56–63, 2017.
- [117] FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.
- [118] BEZERRA, M. A. et al. On-line system for preconcentration and determination of metals in vegetables by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, v. 148, n. 1–2, p. 334–339, 2007.
- [119] LIMA, D. C. et al. Application of Factorial Design and Desirability Function to Develop a Single Analytical Procedure for the Determination of Metals in Different Tissues of Blue Crab (*Callinectes danae*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 9, p. 1885–1893, 2018.
- [120] AMORIM, F. A. C. et al. Multivariate Optimization of Method of Slurry Sampling for Determination of Iron and Zinc in Starch Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Food Analytical Methods*, v. 9, n. 6, p. 1719–1725, 2016.
- [121] PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. *Aplicação De Programa Computacional Livre Em Planejamento De Experimentos:UmTutorial*. *Química Nova*, v. 41, n. 9, p. 1061–1071, 2018.
- [122] DAŞBAŞI, T. et al. Determination of some metal ions in various meat and baby food samples by atomic spectrometry. *Food Chemistry*, v. 197, p. 107–113, 2016.
- [123] SUN, J. et al. One-step synthesis of magnetic graphene oxide nanocomposite and its application in magnetic solid phase extraction of heavy metal ions from biological samples. *Talanta*, v. 132, p. 557–563, 2015.
- [124] FEIST, B.; SITKO, R. Fast and sensitive determination of heavy metal ions as batophenanthroline chelates in food and water samples after dispersive micro-solid phase extraction using graphene oxide as sorbent. *Microchemical Journal*, v. 147, p. 30–36, 2019.
- [125] GOUDA, A. A. A new coprecipitation method without carrier element for separation and preconcentration of some metal ions at trace levels in water and food samples. *Talanta*, v. 146, p. 435–441, 2016.

- [126] SOYLAK, M.; TOPALAK, Z. Multiwalled carbon nanotube impregnated with tartrazine: Solid phase extractant for Cd(II) and Pb(II). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 20, n. 2, p. 581–585, 2014.
- [127] KHAN, M. et al. Preparation and characterization of magnetic allylamine modified graphene oxide-poly(vinyl acetate-co-divinylbenzene) nanocomposite for vortex assisted magnetic solid phase extraction of some metal ions. *Talanta*, v. 146, p. 130–137, 2016.
- [128] BIANCHI, S. R. et al. Production and characterization of a bovine liver candidate reference material. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 733, p. 12006, 2016.
- [129] YAVUZ, E.; TOKALIOĞLU, Ş.; ŞAHAN, S. FAAS Determination of Ag(I) in Water, Anode Slime, Rock and Cream Samples by Solid Phase Extraction Method based on Sepabeads SP207/5-(p-Dimethylaminobenzylidene) Rhodanine Combination. *J. Braz. Chem. Soc*, v. 24, n. 5, p. 736–742, 2013.
- [130] THOMPSON, M.; ELLISON, S.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry - PURE APPL CHEM*, v. 74, p. 835–855, 2002.
- [131] MILLER, J.; MILLER, J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 7<sup>a</sup> ed. [s.l.] Pearson Education Limited, 2018.
- [132] BGM, V. et al. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: part a*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [133] AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent MP Expert Software. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-8975EN.pdf>>. Acesso em: 3 sep. 2021.
- [134] CODEX. Committee on Contaminants in foods. General standards for contaminants and toxins in food and feed. CXS 193-1995, 2018.
- [135] PILARCZYK, R. Concentrations of Toxic and Nutritional Essential Elements in Meat from Different Beef Breeds Reared under Intensive Production Systems. *Biological Trace Element Research*, v. 158, n. 1, p. 36–44, 2014.
- [136] ATARO AMBUSHE, A. et al. Assessment of levels of V, Cr, Mn, Sr, Cd, Pb and U in bovine meat. *South African journal of chemistry. Suid-Afrikaanse tydskrif vir chemie*, v. 65, p. 159–164, 2012.
- [137] BOSCH, A. C. et al. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, n. 1, p. 32–48, 2015.
- [138] HICKS, C. C. et al. Harnessing global fisheries to tackle micronutrient deficiencies. *Nature*, v. 574, n. 7776, p. 95–98, Oct. 2019.
- [139] HASSELBERG, A. E. et al. Fish for food and nutrition security in Ghana: Challenges and opportunities. *Global Food Security*, v. 26, p. 100380, 2020.
- [140] OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- [141] SEEGER, T. S. et al. Feasibility of DLLME for the Extraction and Preconcentration of As and Cd in Sugar for Further Determination by ICP-MS. v. 28, n. 9, p. 1691–1697, 2017.

- [142] SEEGER, T. et al. Feasibility of DLLME for the Extraction and Preconcentration of As and Cd in Sugar for Further Determination by ICP-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, 2017.
- [143] GROHMANN, A. *Around the World in 18 Elements*. By David Scott. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 53, n. 41, p. 10857, 2014.
- [144] MERTZ, W. The essential trace elements. *Science*, v. 213, n. 4514, p. 1332–1338, 1981.
- [145] KABATA-PENDIAS, A. MUKHERJEE, A. B. *Trace Elements from Soil to Human*. Berlin: Springer-Verlag, 2007.
- [146] OOSTHUIZEN, J. *Environmental Health-Emerging Issues and Practice*. Croatia: IntechOpen, 2012.
- [147] HIRATA, S.; TOSHIMITSU, H.; AIHARA, M. Determination of Arsenic Species in Marine Samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical Sciences*, v. 22, n. 1, p. 39–43, 2006.
- [148] SÁ, I. P. DE; SOUZA, G. B. DE; ARAUJO NOGUEIRA, A. R. DE. Chromium speciation in organic fertilizer by cloud point extraction and optimization through experimental Doehlert design as support for legislative aspects. *Microchemical Journal*, v. 160, p. 105618, 2021.
- [149] SILVA, A. B. S. et al. Feasibility of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Molybdenum Determination in Lamb Meat by MIP OES. *Food Analytical Methods*, p. 496–502, 2020.
- [150] PEKER, D. S. K.; TURKOGLU, O.; SOYLAK, M. Dysprosium(III) hydroxide coprecipitation system for the separation and preconcentration of heavy metal contents of table salts and natural waters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 143, n. 1, p. 555–560, 2007.
- [151] SOYLAK, M.; KAYA, B.; TUZEN, M. Copper(II)-8-hydroxquinoline coprecipitation system for preconcentration and separation of cobalt(II) and manganese(II) in real samples. *Journal of Hazardous Materials*, v. 147, n. 3, p. 832–837, 2007.
- [152] TUZEN, M.; SOYLAK, M. Multi-element coprecipitation for separation and enrichment of heavy metal ions for their flame atomic absorption spectrometric determinations. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, n. 2, p. 724–729, 2009.
- [153] SOYLAK, M.; BALGUNES, H. Gadolinium hydroxide coprecipitation system for the separation–preconcentration of some heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, v. 155, n. 3, p. 595–600, 2008.
- [154] CITAK, D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Simultaneous coprecipitation of lead, cobalt, copper, cadmium, iron and nickel in food samples with zirconium(IV) hydroxide prior to their flame atomic absorption spectrometric determination. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 9, p. 2302–2307, 2009.
- [155] SOYLAK, M.; ONAL, G. Determination of trace metals by atomic absorption spectrometry after coprecipitation with europium hydroxide. *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, n. 2, p. 1130–1134, 2006.
- [156] CHEN, Q. et al. Determination of Cadmium in Shrimp and Shell Fish Samples by Coprecipitation Enrichment with Mn(II)-5-Br-PADAP Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu*, v. 36, n. 10, p. 3351–3354, 2016.
- [157] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; WEST, D. M. *Fundamentos de Química Analítica*. 9<sup>a</sup> Ed. ed. Cengage Learning, 2014.

- [158] OYMAK, T. et al. Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method. *Food Chemistry*, v. 113, n. 4, p. 1314–1317, 2009.
- [159] ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M. Carrier element-free coprecipitation and speciation of inorganic tin in beverage samples and total tin in food samples using N-Benzoyl-N,N-diisobutylthiourea and its determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, v. 63, n. 2, p. 1091–1096, 2015.
- [160] ULUOZLU, O. D. et al. Coprecipitation of trace elements with Ni<sup>2+</sup>/2-Nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid and their determination by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, v. 176, n. 1, p. 1032–1037, 2010.
- [161] BARNES, J. D. et al. *Vogel - Análise Química Quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro. 2001.
- [162] MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasil, 2011.
- [163] FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*. São Paulo: Unicamp, 2015.
- [164] FATIBELLO-FILHO, O. *Equilíbrio Iônico: aplicações em química analítica*. São Carlos: EdUFSCar, 2016.
- [165] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). CERCLA priority list of hazardous substances, Atlanta, GA: ATSDR, Public Health Service. 2019.
- [166] IARC. A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres, and dusts. França: International Agency for Research on Cancer, 2012.
- [167] COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. Manole, 2005.
- [168] FUENTES, A. et al. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry*, v. 112, n. 2, p. 295–302, 2009.
- [169] POHLENZ, C.; GATLIN, D. M. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, v. 431, p. 111–117, 2014.
- [170] HE, K. Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement? *Progress in cardiovascular diseases*, v. 52, n. 2, p. 95–114, 2009.
- [171] Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). *AGROFIT*, Brasília (Brazil): MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária. 2004.
- [172] FRANCESCONI, K. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry - PURE APPL CHEM*, v. 82, p. 373–381, 2010.
- [173] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AVISA). Instrução Normativa IN nº 88, de 26 de Março de 2021.
- [174] SCHMIDT, L. et al. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS. *Food chemistry*, v. 255, p. 340–347, 2018.
- [175] PETURSDOTTIR, A. H.; SLOTH, J. J.; FELDMANN, J. Introduction of regulations for arsenic in feed and food with emphasis on inorganic arsenic, and implications for analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, n. 28, p. 8385–8396, 2015.

- [176] FSANZ - Food Standards Australia New Zealand. Code: Standard 1.4.1 - Contaminants and natural toxicants. 2011 .
- [177] MOH - Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard: Maximum levels of contaminants in food - GB 2762. 2012.
- [178] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *European Food Safety Authority Journal*, v. 12, 2014.
- [179] UNCETA, N. et al. A novel strategy for Cr(III) and Cr(VI) analysis in dietary supplements by speciated isotope dilution mass spectrometry. *Talanta*, v. 154, p. 255–262, 2016.
- [180] HERNANDEZ, F. et al. Cr(VI) and Cr(III) in milk, dairy and cereal products and dietary exposure assessment. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 12, n. 3, p. 209–215, 2019.
- [181] CARIONI, V. M. O. et al. Use of neutron activation analysis and LC–ICP-MS in the development of candidate reference materials for As species determination. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 299, n. 1, p. 241–248, 2014.
- [182] BAER, I. et al. Performance of laboratories in speciation analysis in seafood – Case of methylmercury and inorganic arsenic. *Food Control*, v. 22, n. 12, p. 1928–1934, 2011.
- [183] DAHL, L. et al. Stability of arsenic compounds in seafood samples during processing and storage by freezing. *Food Chemistry*, v. 123, n. 3, p. 720–727, 2010.
- [184] SANTOS, C. M. M. et al. Evaluation of microwave and ultrasound extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 86, p. 108–114, 2013.
- [185] PIZARRO, I. et al. Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies. *Analytica Chimica Acta*, v. 495, n. 1, p. 85–98, 2003.
- [186] BENDICHO, C. et al. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 31, p. 50–60, 2012.
- [187] ZMOZINSKI, A. V et al. Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. *Food Chemistry*, v. 173, p. 1073–1082, 2015.
- [188] MARTONE, N. et al. Determination of chromium species in dietary supplements using speciated isotope dilution mass spectrometry with mass balance. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 41, p. 9966–9976, 2013.
- [189] NOVOTNIK, B.; ZULIANI, T. Chromate in food samples : an artefact of wrongly. p. 558–566, 2013.
- [190] NOVOTNIK, B. et al. Content of trace elements and chromium speciation in Neem powder and tea infusions. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, v. 31, p. 98–106, 2015.
- [191] NI, Z. et al. Determination of trivalent chromium and hexavalent chromium in dried edible fungi by microwave ashing-liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chinese journal of chromatography*, v. 32, n. 2, p. 174–178, 2014.
- [192] BOLEA-FERNANDEZ, E. et al. Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 32, n. 9, p. 1660–1679, 2017.

- [193] CAI, Y. et al. Gold nanoparticles as intermediate ligands for polymer monolithic capillary microextraction of trace rare earth elements followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 127, p. 56–63, 2017.
- [194] SAADAWI, R. et al. The hookah series part 2: elemental analysis and arsenic speciation in hookah charcoals. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 29, n. 11, p. 2146–2158, 2014.
- [195] EBDON, L. et al. (EDS.). *Trace Element Speciation for Environment{,} Food and Health*. The Royal Society of Chemistry, 2001.
- [196] MÖLLER, K.; SCHULTHEISS, U. Chemical characterization of commercial organic fertilizers. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 61, n. 7, p. 989–1012, 2015.
- [197] CIAVATTA, C. et al. Chromium-Containing Organic Fertilizers from Tanned Hides and Skins: A Review on Chemical, Environmental, Agronomical and Legislative Aspects. *Journal of Environmental Protection*, v. 3, n. 11, p. 1532–1541, 2012.
- [198] REGULATION EU. Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of June 5 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regula, 2019.
- [199] VITALE, R. J.; MUSSOLINE, G. R.; RINEHIMER, K. A. Environmental Monitoring of Chromium in Air, Soil, and Water. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 26, n. 1, p. S80–S85, 1997.
- [200] DAYAN, A. D.; PAINE, A. J. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Human & Experimental Toxicology*, v. 20, n. 9, p. 439–451, 2001.
- [201] SAGER, M. About Chromium (VI) Extraction from Fertilizers and Soils. *Economic and Environmental Geology*, v. 38, 2005.
- [202] ZHANG, J. et al. Mechanism study of humic acid functional groups for Cr(VI) retention: Two-dimensional FTIR and <sup>13</sup>C CP/MAS NMR correlation spectroscopic analysis. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 86–92, 2017.
- [203] MORTADA, W. I. Recent developments and applications of cloud point extraction: A critical review. *Microchemical Journal*, v. 157, p. 105055, 2020.
- [204] ABOU EL-REASH, Y. G. et al. Micelle-mediated extraction for speciation and spectrophotometric determination of iron using a newly synthesized salicylic acid derivative. *Microchemical Journal*, v. 158, p. 105280, 2020.
- [205] BULUT, V. N. et al. Carrier element-free coprecipitation (CEFC) method for the separation, preconcentration and speciation of chromium using an isatin derivative. *Analytica Chimica Acta*, v. 632, n. 1, p. 35–41, 2009.
- [206] OZKANTAR, N. et al. Ultrasonic-assisted Supramolecular Solvent Liquid-liquid Microextraction for Inorganic Chromium Speciation in Water Samples and Determination by UV-Vis Spectrophotometry. *Atomic Spectroscopy -Norwalk Connecticut-*, v. 41, p. 43–50, 2020.
- [207] BEZERRA, M. DE A.; ARRUDA, M. A. Z.; FERREIRA, S. L. C. Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 40, n. 4, p. 269–299, 2005.

[208] JCGM 100:2008. Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement; (GUM 1995 with Minor Corrections), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), 2008.

[209] SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré\_concentração no ponto nuvem. Ecl. Quím., v. 31, n. 1, p. 73–80, 2006.

[210] KRÜGER, O. et al. Determination of chromium (VI) in primary and secondary fertilizer and their respective precursors. Chemosphere, v. 182, p. 48–53, 2017.

[211] TAYLOR, B. N.; KUYATT, C. E. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1994.

[212] LEŚNIEWSKA, B. et al. An ultrasound-assisted procedure for fast screening of mobile fractions of Cd, Pb and Ni in soil. Insight into method optimization and validation. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 24, p. 25093–25104, 2016.