

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ÁGUA E TECIDO DE PEIXE  
EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E  
ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA  
ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)**

**André Abreu Grieco\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre Profissional em Química, área de concentração: Química Tecnológica

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini**

**\* Venturo Análises Ambientais**

São Carlos - SP  
2023

Grieco, Andre Abreu

Especiação de arsênio em água e tecido de peixe empregando extração em fase sólida (SPE) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) / Andre Abreu Grieco -- 2023. 92f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Pedro Sergio Fadini

Banca Examinadora: Pedro Sergio Fadini, Felipe André dos Santos, Renato Lajarim Carneiro

Bibliografia

1. Especiação de Arsênio. 2. Extração em Fase Sólida. 3. ICP OES. I. Grieco, Andre Abreu. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato André Abreu Grieco, realizada em 28/02/2023.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe André dos Santos (FCE/UNESP)

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

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

## AGRADECIMENTOS

Muito obrigado a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a conclusão deste trabalho:

À Venturo Análises Ambientais, sua diretoria e gerência, que me incentivaram, apoiaram e possibilitaram meu ingresso no Mestrado Profissional, me proporcionando total autonomia, condições materiais e orientação para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Química, pelo oferecimento do programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e, em especial, do Mestrado Profissional.

Aos funcionários do PPGQ pelo apoio administrativo durante o Mestrado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini, por ter aberto as portas para mim, pela paciência, orientação, confiança e aprendizado.

A todos os meus colegas funcionários da Venturo pelo apoio, companhia e, principalmente, pela dedicação à empresa, o que torna possível seu funcionamento e crescimento contínuo.

À Ligia, minha companheira de vida, pelo apoio fundamental em todos os momentos, orientação, compreensão, amor e carinho.

À minha família, meus pais Izabel e Fábio e meus irmãos Fábio e Ricardo, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AsB</b>	Arsenobetaína
<b>AsC</b>	Arsenocolina
<b>CGCRE</b>	Coordenação geral de acreditação do INMETRO
<b>DMA</b>	Ácido dimetilarsínico
<b>EPT</b>	Elementos potencialmente tóxicos
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<b>LMP</b>	Limite máximo permitido
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MMA</b>	Ácido monometilarsônico
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Percentual (%) de retenção das espécies de As nos cartuchos de troca catiônica. ....	40
TABELA 2 – Percentual (%) de retenção das espécies de As nos cartuchos de troca aniônica. ....	40
TABELA 3 – Recuperação média obtida na eluição do DMA.....	43
TABELA 4 – Recuperação média obtida na eluição do MMA .....	43
TABELA 5 – Resultados da especiação de As em água utilizando extração em fase sólida.....	45
TABELA 6 – Resultados da especiação de As em tecido de peixe utilizando extração em fase sólida. ....	47
TABELA 7 – Dados brutos para construção da curva analítica em triplicata do As total. ....	49
TABELA 8 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III) em água .....	50
TABELA 9 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (V) em água .....	51
TABELA 10 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do DMA. ....	51
TABELA 11 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do MMA .....	52
TABELA 12 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (III) .....	53
TABELA 13 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (V) .....	54
TABELA 14 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de DMA .....	55
TABELA 15 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de MMA .....	55

TABELA 16 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (III) em água.....	56
TABELA 17 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (V) em água.....	57
TABELA 18 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – DMA em água.....	57
TABELA 19 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – MMA em água.....	58
TABELA 20 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III) em peixe .....	59
TABELA 21 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (V) em peixe .....	60
TABELA 22 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do DMA em peixe .....	60
TABELA 23 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do MMA em peixe .....	61
TABELA 24 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (III) em peixe.....	62
TABELA 25 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (V) em peixe.....	62
TABELA 26 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de DMA em peixe .....	62
TABELA 27 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de MMA em peixe.....	63
TABELA 28 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (III) em peixe.....	63
TABELA 29 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (V) em peixe .....	64

TABELA 30 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – DMA em peixe .....	65
TABELA 31 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – MMA em peixe .....	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fachada do laboratório Venturo, onde o projeto foi desenvolvido .....	17
FIGURA 2 – Esquema representando o método desenvolvido para especiação de Arsênio utilizando cartuchos de SPE. ....	19
FIGURA 3 – Grupos funcionais dos cartuchos de troca catiônica .....	21
FIGURA 4 – Grupos funcionais dos cartuchos de troca aniônica .....	21
FIGURA 5 – Cartuchos SPE de fabricação nacional utilizados nos ensaios.....	22
FIGURA 6 – Sistema <i>manifold</i> para extração em fase sólida com cartuchos ....	23
FIGURA 7 – Sonicador Ultrassônico, Ultronique QR 500, potência <i>ultrassônica</i> 500 watts.....	25
FIGURA 8 – Sistema de concentração composto por um banho-maria associado a um sistema de vácuo e recuperação de solvente por condensação. ....	26
FIGURA 9 – ICP - OES PerkinElmer AVIO 200. ....	27
FIGURA 10 – Fluxograma do procedimento para cálculo de incerteza.....	34
FIGURA 11 – Diagrama de “causa efeito” para cálculo de incerteza em análises cromatográficas e espectrofotométricas.....	35
FIGURA 12 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do DMA no cartucho de troca catiônica WCX. ....	37
FIGURA 13 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do DMA no cartucho de troca catiônica SCX. ....	38
FIGURA 14 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do As (V) no cartucho de troca catiônica SCX.....	39
FIGURA 15 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do As (V) no cartucho de troca aniônica SAX. ....	39
FIGURA 16 – Diagrama esquemático do ensaio de especiação de As em água. .....	44

FIGURA 17 – Diagrama esquemático do ensaio de especiação de As em tecido de peixe.....	47
FIGURA 18 – Curva analítica de calibração do As total.....	49

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Exemplos de espécies de Arsênio.....	10
---	----

## RESUMO

ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO EM ÁGUA E TECIDO DE PEIXE EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES). Os efeitos adversos causados por elementos químicos potencialmente tóxicos no ambiente e na saúde humana dependem das espécies químicas desses elementos, visto que elas possuem diferenças, principalmente quanto à toxicidade. A exposição ao Arsênio (As) é um problema de saúde pública global, o que tem levado a um aumento na procura por análises de especiação de As. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método de especiação de As em água e tecido de peixe direcionado à quantificação de As (III), As (V), DMA e MMA para inclusão no escopo de análises do laboratório Venturo. Para isso, foi empregada extração em fase sólida (SPE) e determinação por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O método de separação se baseou em duas extrações sequenciais, uma em cartucho de troca catiônica (SCX) e a outra em aniônica (SAX). O DMA ficou retido no SCX e foi eluído com ácido nítrico  $1 \text{ mol l}^{-1}$ . O As (III) não ficou retido em nenhum dos cartuchos e foi coletado ao final da extração. As (V) e MMA ficaram retidos no SAX, onde o MMA foi eluído com ácido acético  $1 \text{ mol l}^{-1}$  e o As (V) foi quantificado por somatória. A partir dos testes de retenção seletiva das espécies em quatro cartuchos de fabricação nacional, os cartuchos Purifica SCX e Purifica SAX foram selecionados, pois demonstraram recuperações adequadas para especiação de As. Para o tecido de peixe foi desenvolvido um método de extração com solventes polares, sonificador e centrifugação, em que foi obtido um extrato aquoso que foi submetido ao mesmo método de separação das espécies de As desenvolvido para água. Esse método também apresentou eficiência na recuperação para todas as espécies. Por fim, os métodos foram submetidos à

validação metodológica que demonstrou que o laboratório está apto e poderá solicitar ao INMETRO a inclusão da especiação de As considerando as espécies As (III), As (V), DMA e MMA em seu escopo de análises. O limite de quantificação a ser reportado é de  $0,050 \text{ mg l}^{-1}$  para água e  $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$  para tecido de peixe.

Palavras-chave: especiação de arsênio, SPE, extração em fase sólida, água, tecido de peixe, ICP-OES

## ABSTRACT

ARSENIC SPECIATION IN WATER AND FISH TISSUE USING SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) AND INDUCTIVELY COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY (ICP-OES). The adverse effects caused by potentially toxic elements on the environment and human health vary according to the elements' species, which differ in terms of toxicity. Arsenic (As) exposure is a global public health problem, which has led to an increased demand for As speciation analysis. The goal of this research was to develop a method for As speciation in water and fish samples considering As(III), As(V), DMA, and MMA species to be included in the scope of the *Venturo Análises Ambientais* laboratory. For this, Solid Phase Extraction (SPE) was coupled with Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectroscopy (ICP-OES) detection. The method developed was based on two sequential extractions, one using a cation exchange cartridge (SCX) and the other an anion exchange (SAX) cartridge. DMA was retained on the SCX cartridge and eluted with 1 mol l<sup>-1</sup> nitric acid. As(III) was not retained on the cartridges and was collected at the end of the extraction. As(V) and MMA were retained on the SAX cartridge, MMA was eluted with 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid, and As(V) was quantified by calculation. After testing the selective detection of As species using four cartridges manufactured in Brazil, Purifica SCX and Purifica SAX were selected since they showed satisfactory retention percentages. The method for fish tissue samples was based on extraction with polar solvents, sonication, and centrifugation and was effective in recovering As species. In this procedure, an aqueous extract was obtained and submitted to the same separation process proposed for water samples. The methods were validated, and the *Venturo Análises Ambientais* can request to INMETRO the inclusion of As speciation considering As(III), As(V), DMA, and MMA in the laboratory scope. The

quantification limit to be reported is  $0.050 \text{ mg l}^{-1}$  for water and  $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$  for fish tissue samples.

Keywords: arsenic speciation, SPE, solid phase extraction, water, fish tissue, ICP-OES.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Referencial teórico .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Arsênio: aspectos gerais e espécies químicas .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Especiação de Arsênio .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Extração por solvente .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Extração em fase sólida (SPE) .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Metodologia .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Local de estudo.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Método para separação das espécies químicas de arsênio em água ...</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Extração e separação das espécies de arsênio em tecido de peixe.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Determinação de arsênio total .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Reagentes e padrões.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Validação dos métodos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.6.1 Cálculo de incerteza.....</b>	<b>33</b>
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Retenção seletiva das espécies de arsênio .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1 Eluição das espécies de arsênio .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Especiação de arsênio em água.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Especiação de arsênio em tecido de peixe.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Validação do método de especiação de arsênio em água .....</b>	<b>48</b>
<b>5.4.1 Curva analítica.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4.2 Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4.3 Recuperação e repetitividade .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4.4 Cálculo da incerteza .....</b>	<b>55</b>
<b>5.5 Validação do método de especiação de arsênio em tecido de peixe ....</b>	<b>58</b>
<b>5.5.1 Curva analítica.....</b>	<b>59</b>

<b>5.5.2</b>	<b>Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>59</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Recuperação e repetitividade .....</b>	<b>61</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Cálculo da incerteza .....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>69</b>

## 1. Introdução

À medida que as atividades antrópicas avançam e as mudanças climáticas ameaçam causar alterações profundas no ciclo hidrológico, o declínio na qualidade da água torna-se uma preocupação global (ABBOTT et al., 2019). A expansão e intensificação dos diferentes usos alternativos do solo são os maiores causadores da degradação da qualidade da água no mundo, com destaque para as áreas urbanas e agrícolas. Nos sistemas de água doce brasileiros, os efluentes agrícolas e urbanos são as maiores fontes de poluição (MELLO et al., 2018; GIRI; QIU, 2016).

Nesse contexto, a poluição por elementos químicos potencialmente tóxicos é um efeito inevitável das atividades antrópicas que a humanidade tem dado cada vez mais atenção, o que refletiu no aumento de estudos a respeito desses elementos, e.g., remediações (WU et al., 2019), avaliações de risco à saúde humana (SAHA et al., 2017; HUANG et al., 2018), avaliação de comportamento biogeoquímico (SANA KHALID et al., 2017) e, fundamentalmente, no desenvolvimento de métodos para análise química quantitativa (URBAN; ROMERO; CAMPOS, 2018; KÜPPER et al., 2019; PARK et al., 2019).

A contaminação generalizada de solos e sistemas aquáticos por elementos potencialmente tóxicos (EPT) vem ganhando destaque mundialmente pela preocupação com a saúde humana e ambiental (ANASTOPOULOS et al., 2019). Os EPTs catiônicos referem-se geralmente a metais, e os aniônicos a metaloides. Os metais e metaloides ocorrem naturalmente no ambiente e alguns são nutrientes essenciais, pois exercem várias funções bioquímicas e fisiológicas (KIRAN MARELLA; SAXENA; TIWARI, 2020). São exemplos de metais essenciais o Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Molibidênio (Mo), Selênio (Se) e Zinco (Zn)

(RENGEL, 2004; BOLAN et al., 2013). Os elementos químicos arsênio (As), alumínio (Al), bário (Ba), berílio (Be), cádmio (Cd), gálio (Ga), ouro (Au), chumbo (Pb), lítio (Li), mercúrio (Hg), platina (Pt), prata (Ag), vanádio (V), urânio (U) entre outros, são considerados não essenciais, pois não possuem funções biológicas estabelecidas (TCHOUNWOU et al., 2012).

As emissões de poluentes por atividades humanas elevam a concentração no ambiente não só de elementos não essenciais tóxicos, mas também de elementos essenciais que podem se tornar tóxicos para os organismos vivos dependendo da sua concentração (BOLAN et al., 2013). As principais fontes de poluição por EPTs são: mineração, atividades industriais, processamento e fundição de metais, emissões de fábricas, lançamento de esgotos e uso de agroquímicos e fertilizantes (WUANA; OKIEIMEN, 2011; CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2015; HAMID et al., 2020). Esse tipo de poluição, além de causar degradação em diversas matrizes ambientais como água, solo, ar e alimentos, pode se acumular em órgãos vitais humanos e representar uma ameaça à saúde (BOSCH et al., 2016; MA et al., 2016).

Os elementos que se destacam devido ao alto grau de toxicidade e bioacumulação são As, Pb, Cd, Cr e Hg. O Pb, por exemplo, que é liberado no meio ambiente principalmente pela fabricação de baterias e drenagem ácida de minas, está relacionado a distúrbios neurológicos graves (TCHOUNWOU et al., 2012). O Cd, que se espalhou por terras agrícolas por ser uma impureza de fertilizantes fosfatados, aumenta o risco de danos aos rins e de câncer de próstata em humanos (HUANG et al., 2018). O As, que é utilizado em formulações na indústria madeireira, inibe a fotossíntese nas plantas e causa efeitos genotóxicos ao seres humanos (FLOREA et al., 2004; DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013).

À medida que os efeitos dos EPTs se tornaram mais conhecidos, as restrições ao seu uso também aumentaram. Agências governamentais em todo mundo impuseram limites na concentração de metais e metaloides em diferentes matrizes ambientais, com destaque para água, a fim de minimizar a exposição dos ecossistemas a esses elementos tóxicos. O Arsênio, por exemplo, tem seu limite máximo permitido em água para consumo humano definido em  $10 \text{ ug.L}^{-1}$ , tanto no Brasil (BRASIL, 2017), quanto nos Estados Unidos (USEPA, 2018), Canadá (HEALTH CANADA, 2019), China (MINISTRY OF HEALTH OF CHINA, 2006), União Europeia (CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, 1998), e pela própria Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017).

Como consequência, há uma grande demanda pelo monitoramento regular da qualidade de águas superficiais, subterrâneas, entre outras matrizes ambientais, a fim de identificar e avaliar a poluição por EPT (GUEZGOUZ et al., 2020). Há também uma grande diversidade de técnicas analíticas de detecção e quantificação desses elementos como espectrometria de absorção atômica (OLASOJI et al., 2019), fluorescência de raios-x por energia dispersiva (EDXRF) (ARSHAD et al., 2022), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP - OES) (BUSSAN; HARRIS; DOUVRIS, 2019) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP - MS) (DÜNDAR; HUSEYIN, 2018).

É importante ressaltar que esses elementos são abordados nas legislações em termos de concentrações totais. Contudo, os efeitos adversos causados pelos EPTs ao ambiente e à saúde humana estão relacionados às formas ou espécies químicas nas quais esses elementos ocorrem. Essas espécies químicas podem se diferenciar pelo estado de oxidação, composição isotópica, compostos orgânicos e inorgânicos e seus complexos, estrutura molecular e ligantes covalentes. Essas diferenças

desempenham papel fundamental na biodisponibilidade, toxicidade, nos processos fisiológicos, na mobilidade e solubilidade do metal (TCHOUNWOU et al., 2012; RAJAKOVIĆ et al., 2013). Nesse contexto, o Arsênio se destaca, pois a exposição a esse elemento pode causar efeitos mutagênicos, teratogênicos, neurotóxicos e genotóxicos, o que torna a contaminação por arsênio um problema de saúde pública global. Esses efeitos adversos dependem das diferentes espécies químicas de Arsênio, as quais estão amplamente distribuídas no ambiente (FLOREA et al., 2004; DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013).

Devido à grande diferença de toxicidade e comportamento biogeoquímico entre as espécies químicas de Arsênio, o conhecimento apenas da concentração total desse elemento se torna insuficiente. Para compreender de forma mais adequada os efeitos observados no ambiente e em sistemas vivos é necessária a realização de ensaios de especiação química, de forma a obter pelo menos a quantificação das espécies químicas mais tóxicas. Essa necessidade está refletida na literatura dos últimos vinte anos, em que se observa vários estudos para especiação química de Arsênio em diversas matrizes e utilizando diferentes técnicas de separação e determinação (POZEBON et al., 1998; CHUNHAI YU et al., 2003; CHEN et al., 2006; ISSA et al., 2010; SUGÁR et al., 2013; GAO et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018; PARK et al., 2019; ARDINI; DAN; GROTTI, 2019; TORRES; ALONSO, 2021).

No Brasil, embora as espécies de Arsênio não tenham concentrações máximas estabelecidas em legislações ambientais e de saúde, tem havido aumento na procura por análises de especiação desse elemento visando ao monitoramento ambiental mais adequado. O aumento dessa demanda tem sido observado pela Venturo Análises Ambientais, principalmente nos últimos dois anos, pois o laboratório tem sido

procurado para realizar especificação de Arsênio tanto em água como em peixe.

Poucos laboratórios de análises ambientais acreditados pelo INMETRO oferecem esse tipo de análise no Brasil. Somado a isso, a Venturo já se destaca no mercado de análises ambientais do país realizando especificação de Mercúrio e análises em matriz Biota, i.e., peixes, moluscos, crustáceos e outros. Isso explica também a procura pela Venturo para realizar especificação de Arsênio. Diante disso, é necessário o desenvolvimento de métodos para especificação de Arsênio e a inclusão desses ensaios no escopo de análises do laboratório.

## 2. Objetivos

### Objetivo geral

Desenvolver um método para especiação química do Arsênio em água e tecido de peixe empregando extração em fase sólida (SPE) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP - OES).

### Objetivos específicos

- Separar as espécies As (III), AS (V), ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA) em água utilizando resinas cromatográficas de troca iônica em cartuchos de SPE;
- Avaliar ao menos quatro resinas de troca iônica de fabricação nacional e identificar em qual é obtida a melhor seletividade e eficiência na separação;
- Desenvolver um método para extração das espécies de As dos tecidos de peixe;
- Validar os métodos seguindo as normas da NBR ISO/IEC 17025 para solicitar a inclusão das análises de especiação de As no escopo INMETRO do laboratório.

### **3. Referencial teórico**

#### **3.1. Arsênio: aspectos gerais e espécies químicas**

O Arsênio (As) é um metaloide do grupo 15 da tabela periódica amplamente encontrado na atmosfera, rochas, solos, águas e sistemas vivos, sendo considerado o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002; SINGH; PANT, 2004). Calcula-se que as fontes naturais sejam responsáveis por 60% da contaminação por As (AMMANN, 2011), principalmente as de origem geológica, já que o As é componente de mais de 300 minerais e substâncias sólidas (BARRINGER; REILLY, 2002). Contudo, o uso excessivo de compostos de As e sua liberação no ambiente por meio de fontes antrópicas como mineração, resíduos industriais, fertilizantes, inseticidas e resíduos de medicamento veterinário tem tornado a contaminação de águas, sedimentos e organismos vivos por As cada vez mais preocupante. As principais fontes de contaminação de As variam entre os países. No Brasil, destacam-se as atividades de mineração e o uso de produtos químicos para conservação de madeira (COSTA, 2019). A principal fonte de exposição humana ao As é o consumo de água e alimentos, especialmente peixes e frutos do mar (CARLIN et al., 2016; LLORENTE-MIRANDES; RUBIO; LÓPEZ-SÁNCHEZ, 2017).

A exposição ao Arsênio é uma preocupação de saúde pública no mundo inteiro. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) reconheceu o As e os compostos de As como agentes cancerígenos do Grupo I, i.e., para os quais já há evidências suficientes de que causam câncer em humanos (WHO, 2012). Alguns efeitos da exposição ao As já estão bem estabelecidos, como os cânceres de pele, pulmão e bexiga, além

de diabetes, lesões de pele e doenças cardiovasculares (HUGHES et al., 2011; WHO, 2012).

A exposição ao As afeta praticamente todos os sistemas de órgãos – gastrointestinal, neurológico, cardíaco, pulmonar, renal, pele e hematológico – podendo levar até a morte em casos agudos e crônicos. Essa toxicidade do As se deve principalmente à sua capacidade de coagular proteínas e formar complexos com coenzimas, o que inibe a produção de adenosina trifosfato em processos metabólicos (TCHOUNWOU et al., 2019).

Milhões de pessoas estão expostas ao As, principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados em países como Índia, Chile, Estados Unidos, Bangladesh e Taiwan. As exposições também podem ocorrer por inalação em ambientes agrícolas e industriais (NORDSTROM, 2002; WHO, 2012).

O As existe em diferentes espécies químicas que apresentam diferenças de toxicidade, biodisponibilidade e características de transporte. Mais de 50 espécies químicas naturais contendo arsênio já foram identificadas (HUNG; NEKRASSOVA; COMPTON, 2004; HEDEGAARD; SLOTH, 2011). Nessas espécies, o As pode ser encontrado em quatro estados de oxidação diferentes –  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{As}^0$  e  $\text{As}^{3-}$  – tanto nas formas orgânicas como inorgânicas (HEDEGAARD; SLOTH, 2011; KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2011). O arsênio inorgânico compreende os oxianions arsenito As (III), também conhecido como ácido arsenioso, e o arsenato As (V), também chamado de ácido arsênico. Existem vários compostos orgânicos de arsênio no ambiente, sendo os mais comuns e mais tóxicos o ácido monometilarsônico (MMA) e o ácido dimetilarsínico (DMA) (RAJAKOVIĆ et al., 2013; CARLIN et al., 2016). A toxicidade do arsênio está relacionada à sua solubilidade, que por sua vez é afetada por condições físico-químicas do meio como pH e

potencial redox. Em condições redutoras, o arsenito ( $\text{AsO}_3^{-3}$ , As (III)) é a forma dominante, enquanto em ambientes oxigenados o arsenato ( $\text{AsO}_4^{-3}$ , As (V)) é geralmente a forma mais estável (ANUKRATI SHUKLA; SRIVASTAVA, 2017). Entre as várias espécies orgânicas e inorgânicas de As, as inorgânicas As(III) e As(V) são consideradas mais tóxicas devido à sua biodisponibilidade, sendo conhecidas por seus efeitos toxicológicos (PLANER-FRIEDRICH et al., 2017). As espécies inorgânicas são cerca de 100 vezes mais tóxicas que as orgânicas. Além disso, o As(III) é cerca de 60 vezes mais tóxico que o As(V). Nas espécies orgânicas, a toxicidade geralmente diminui com o aumento do grau de metilação, tanto que a metilação do arsênio inorgânico no organismo é um processo de desintoxicação que reduz a afinidade do composto pelos tecidos (JAIN; ALI, 2000; RAJAKOVIĆ et al., 2013; PLANER-FRIEDRICH et al., 2017).

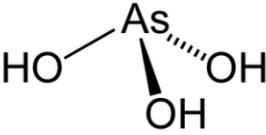
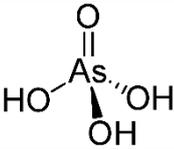
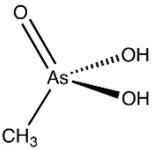
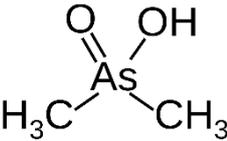
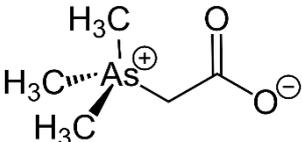
Há várias espécies orgânicas de As presentes em amostras biológicas, como a arsenobetaina (AB) e arsenocolina (AC), que são encontradas principalmente em peixes e na biota aquática. Esses compostos são considerados não tóxicos. Além destes, há os arseno-açúcares encontrados principalmente em algas marinhas e que são considerados compostos de baixa toxicidade (CONTRERAS-ACUÑA et al., 2013; PLANER-FRIEDRICH et al., 2017). No QUADRO 1 podem ser observadas algumas das principais espécies de Arsênio.

No Brasil há limites máximos determinados apenas para concentração de As total. Na água para consumo humano esse limite é de  $10 \text{ ug l}^{-1}$  (BRASIL, 2017), assim como nos corpos de águas superficiais de classe 1 e 2 (BRASIL, 2005). Além disso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio de uma Instrução Normativa que estabelece o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), determina valores máximos de As para o leite ( $50 \text{ ug l}^{-1}$ ), mel ( $300 \text{ ug l}^{-1}$ ), pescado ( $1000 \text{ ug kg}^{-1}$ ), rins

bovinos, suínos e caprinos ( $1000 \text{ ug kg}^{-1}$ ) e fígado de aves ( $1000 \text{ ug kg}^{-1}$ ) (MAPA, 2019).

Dada as diferenças entre as espécies químicas de As, somado ao fato de que um elemento químico pode ser convertido em outro composto no ambiente, é fundamental conhecer as formas químicas e físicas desse elemento para obter informações sobre sua atividade e toxicidade. Pesquisadores têm avançado na medição mais frequente de espécies específicas de arsênio, tanto em amostras ambientais como humanas, de forma a obter uma compreensão mais completa e detalhada das exposições ao arsênio e dos riscos à saúde e ao meio ambiente (GARCÍA-SALGADO; QUIJANO, 2014; NIEHS, 2014).

QUADRO 1 – Exemplos de espécies de Arsênio.

Espécie	Descrição	Forma molecular
As(III)	ácido arsenioso ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ )	
	trióxido de arsênio ( $\text{As}_2\text{O}_3$ )	-
As(V)	ácido arsênico ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ )	
	pentóxido de arsênio ( $\text{As}_2\text{O}_5$ )	-
MMA	ácido monometilarsônico ( $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ )	
DMA	ácido dimetilarsínico ( $((\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}))$ )	
AsB	arsenobetaína (AsB) ( $((\text{CH}_3)_3\text{As}^+(\text{CH}_2)_2\text{OH})$ )	

FONTE: adaptado de Nogueira et al. (2018) e Wikimedia Commons (2023).

### 3.2. Especificação de Arsênio

Nos últimos anos, diversos métodos foram desenvolvidos para a identificação e quantificação de espécies de As em amostras ambientais, incluindo água, solo, vegetais, frutos do mar, peixes, algas, sangue e cabelo (CONTRERAS-ACUÑA et al., 2013; JEONG et al., 2017; CHEN et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018).

Os novos procedimentos analíticos para a especificação de As vêm aprimorando o reconhecimento das espécies químicas em amostras ambientais e melhorando o conhecimento sobre biogeoquímica, toxicidade e metabolismo desse elemento, o que resulta em melhores avaliações de impacto ambiental e riscos à saúde provocados pela exposição ao As.

A determinação de espécies de As pode ser definida em duas etapas – a separação das espécies e a determinação das espécies. Desenvolver um método de separação apropriado com base nas espécies de arsênio de interesse tem como ponto crítico o preparo da amostra, o qual é determinado pela matriz da amostra e pelas propriedades físico-químicas das espécies de arsênio de interesse. O método apropriado de preparo das amostras precisa oferecer uma alta eficiência de extração, e ao mesmo tempo evitar a interconversão entre as espécies de arsênio. Em amostras sólidas, é preciso considerar como cada etapa do preparo afeta a reprodutibilidade e a eficiência de extração de cada espécie bem como se as formas químicas originais de cada espécie são mantidas (ALAVA et al., 2012; GARCÍA-SALGADO; QUIJANO, 2014; ZHAO et al., 2018). Métodos amenos de extração são recomendados para impedir a conversão de espécies de arsênio no processo de extração. Somado a isso, estudos de validação são fundamentais para monitorar a estabilidade e verificar se não há alteração de espécies químicas durante o processo de preparo da amostra (GONG et al., 2001).

Os métodos bem estabelecidos e mais observados na literatura envolvem o acoplamento de técnicas de separação como a cromatografia iônica (IC) (CUI et al., 2017) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (PARK et al., 2019) unidas a uma técnica de detecção sensível, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (SCHMIDT et al., 2017), espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto (HG-AFS) (GUO et al., 2017), espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG-AAS) (DOS SANTOS et al., 2017), espectrometria de absorção atômica de forno de grafite (GF-AAS) (DE OLIVEIRA et al., 2016) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (ASSIS et al., 2019).

### **3.3 Extração por solvente**

Os solventes polares mais utilizados na extração de espécies de As visando à integridade das espécies são as misturas metanol/água ou acetonitrila/água. Os solventes metanol-água são mais utilizados para extrair as espécies de arsênio polar, enquanto solventes não polares, como a mistura de metanol/clorofórmio ou hexano são usados para extrair espécies não polares (PIZARRO et al., 2003; PEREIRA et al., 2016).

Além da escolha dos solventes, mais três fatores têm contribuído para a eficiência da extração com uso de solventes: a proporção dos solventes, o uso de ultrassom/sonificação e a centrifugação dos extratos. Pizarro et al. (2003) demonstraram a variação nas eficiências de extração de espécies de arsênio em amostras de arroz, frango e peixe alterando a proporção de metanol/água usada para extração. Os autores concluíram que uma proporção de 1:1 de metanol/água forneceu a melhor eficiência para a extração de arsênio. Nogueira et al. (2018), ao trabalhar com amostras de peixe e arroz, e Zheng e Hintelmann (2004), ao analisar

amostras de peixe, obtiveram bons resultados na extração de espécies inorgânicas (As(III) e As(V)) e orgânicas (MMA e DMA) utilizando a mistura metanol/água na proporção 1:1. Os três trabalhos citados submeteram as amostras ao ultrassom e centrifugação. Além disso, mais um fator importante observado nesses trabalhos inclui as extrações múltiplas das amostras. Após a extração, uma etapa de pré-concentração usando liofilização ou evaporação pode ser necessária para detectar baixas concentrações de espécies de arsênio (CIARDULLO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2018).

A cromatografia líquida combinada ao ICP-MS é o método mais utilizado atualmente para separar e determinar as espécies de As devido à sua alta seletividade e sensibilidade (NEARING; KOCH; REIMER, 2014). Em relação à separação cromatográfica, embora a cromatografia de emparelhamento iônico e exclusão iônica tenham sido utilizadas, a cromatografia de troca iônica é a técnica de separação mais utilizada (PÉTURSDÓTTIR et al., 2014; PARK et al., 2019). As diferenças na natureza iônica das espécies mais comuns e mais tóxicas de As tornam a cromatografia de troca iônica uma técnica adequada para separação dessas espécies (CUI et al., 2017; REID et al., 2019b).

A cromatografia de troca iônica tem sido usada na análise de muitos compostos de As, incluindo As (III), As (V), MMA, DMA, arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC) (LIU et al., 2017). A coluna mais comumente usada para separação das espécies de As é uma coluna de troca aniônica forte, que carregada positivamente interage com espécies de arsênio carregadas negativamente (CHEN et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2018)

Na separação cromatográfica dos compostos de As, o tempo de retenção e a resolução dos picos dependem não apenas das constantes de dissociação ácida (pKa) de cada espécie, mas também do pH do

eluente/fase móvel. Com isso, o pH torna-se um dos parâmetros fundamentais para otimizar a separação (AMMANN, 2011). Embora alguns estudos tenham reportado um pH ótimo para a fase móvel variando de 8 a 10 (CONTRERAS-ACUÑA et al., 2013; SCHMIDT et al., 2017), outros trabalhos obtiveram melhor resultado em valores de pH bem próximos a essa faixa. Um exemplo é Chen et al. (2006), que reportaram melhor separação com a fase móvel com pH 7,9, e Nogueira et al. (2018) com pH a 10,2. Essas diferenças são aceitáveis, pois há outros parâmetros cromatográficos que ajudam a determinar a retenção dos compostos e a resolução dos picos. Dois desses parâmetros, também fundamentais, são o tipo de sal usado no eluente e a sua concentração (CHEN et al., 2006; AMMANN, 2011).

Os sais mais utilizados como eluente na cromatografia de troca aniônica são os sais de carbonato, bicarbonato e os de fosfato. Nos procedimentos para separação de espécies de As, os sais de fosfato têm sido utilizados há mais tempo e ainda são os mais escolhidos, com destaque para os sais de fosfato de amônio (CHEN et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2018; PARK et al., 2019). O fosfato, comparado a outros eluentes, é um tampão capaz de alterar na coluna o pH da amostra injetada para o pH do eluente. O fosfato possui menos restrições de pH do que ácidos ou bases e pode ser aplicado dentro de uma faixa média de pH. Ele desempenha um papel indispensável no deslocamento do As(V) em sítios de forte adsorção e proporciona ótimas recuperações em cromatografia (AMMANN, 2010).

### **3.4 Extração em fase sólida (SPE)**

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica eficaz usada na especiação de As, tanto para pré-tratamento de amostras, e.g., pré-concentração de analitos, quanto para separação das espécies. O princípio

dessa técnica é a separação entre uma fase líquida (matriz da amostra) e uma fase sólida (sorvente), e o mecanismo de retenção depende da natureza do sorvente e pode incluir simples adsorção, quelação, troca iônica ou extração em fase sólida de pares de íons (RAJAKOVIĆ et al., 2013).

A SPE oferece vantagens importantes quando comparada à extração líquido-líquido clássica, e.g., melhores recuperações, separação mais rápida da fase com ausência de emulsão, menor custo e mais possibilidades para acoplamento em diferentes técnicas de detecção. Somado a isso, a SPE pode eliminar ou diminuir o uso de solventes do processo, pois a espécie química de interesse pode ser extraída diretamente da matriz líquida para fase sólida (adsorvente) (DAS; GUPTA; DAS, 2012; RAJAKOVIĆ et al., 2013; CHEN; MA; CHEN, 2014).

Ainda, o manuseio simples oferece à SPE uma grande popularidade tanto em análises on-line, quanto off-line de espécies de arsênio combinadas com outras técnicas analíticas. Embora as técnicas on-line sejam mais indicadas por evitar a manipulação da amostra entre a separação e análise, o que diminui os riscos de perda, a abordagem da SPE off-line continua em uso devido à sua flexibilidade e capacidade de analisar o mesmo extrato em várias técnicas (DAS; GUPTA; DAS, 2012; RAJAKOVIĆ et al., 2013).

Muitos materiais já foram adotados para a separação/pré-concentração de espécies de As em amostras ambientais e tiveram eficiência satisfatória na seletividade e pré-concentração. Chunhai Yu et al. (2003) investigaram o comportamento de retenção de oito espécies químicas de Arsênio – As(III), As (V), MMA, DMA, AsB, AsC, TMAO e TMAI – em vários cartuchos de extração em fase sólida a base de sílica. Ao analisar o tipo de sorvente, o pH das amostras, e o eluente para remoção das espécies retidas nos cartuchos, os pesquisadores desenvolveram um método para especiação com base na separação seletiva de espécies de

arsênio por SPE. Foi possível separar as espécies com eficiência utilizando dois cartuchos SPE, um de troca catiônica forte (SCX), e outro de troca aniônica forte (SAX). Além disso, apenas dois tipos de eluente foram utilizados: ácido acético e ácido nítrico, ambos a  $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ . Outros estudos, como o de Sugár et al. (2013), separaram As (V) e As (III) diretamente após a coleta em campo utilizando cartuchos SPE, o que demonstra a praticidade e flexibilidade da técnica.

Embora o acoplamento da cromatografia líquida com ICP-MS seja apontado como a técnica mais moderna e eficiente devido à sua sensibilidade e seletividade, ela possui altíssimo custo de investimento. Assim, o uso de técnicas de extração em fase sólida é uma alternativa para o desenvolvimento de métodos de especiação de As que apresentem eficiência, rapidez e seletividade com custo mais acessível, principalmente quando se trata de laboratórios que comercializam análises.

## 4. Metodologia

O desenvolvimento do projeto ocorreu integralmente na empresa Venturo Análises Ambientais Ltda. – EPP.

### 4.1 Local de estudo

A Venturo Análises Ambientais (FIGURA 1) é um laboratório localizado no município de Araraquara-SP que iniciou suas atividades em 2012. A empresa presta serviços de análises em diversas matrizes ambientais como águas, solos, sedimentos, biota, efluentes industriais e domésticos. O laboratório busca atender aos parâmetros analíticos das legislações ambientais do país, além de oferecer outras análises que possam suprir as demandas comerciais.



FIGURA 1 – Fachada do laboratório Venturo, onde o projeto foi desenvolvido  
FONTE: Venturo Análises Ambientais (2023).

A Venturo conta com setores técnicos de Cromatografia, Espectrometria de emissão, Microbiologia, Fluorescência atômica e Analítico (métodos espectrofotométricos e titulométricos). O laboratório é

acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO para ensaios NBR ISO/IEC 17025 sob número 665 e possui um dos escopos mais completos do país para análises ambientais.

## **4.2 Método para separação das espécies químicas de arsênio em água**

Para separação das espécies de As em água foi desenvolvido um método de extração em fase sólida utilizando cartuchos SPE preenchidos com resina de troca iônica. A partir daí, foi possível separar as espécies As (III), As (V), ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA) por meio de retenção e eluição seletiva.

O desenvolvimento desse método teve como base os estudos realizados por Chunhai Yu et al. (2003). Naquele trabalho, os autores avaliaram o comportamento de retenção de oito espécies de Arsênio em diversos cartuchos SPE, examinando o tipo de sorvente/resina e fatores como pH e o eluente mais eficaz. A partir dos resultados, eles propuseram um método para especificação de As baseado na separação seletiva das espécies em cartuchos SPE.

Na FIGURA 2 está representado um esquema do método utilizado pelo presente trabalho para especificação de As utilizando cartuchos SPE, baseado no método proposto por Chunhai Yu et al. (2003).

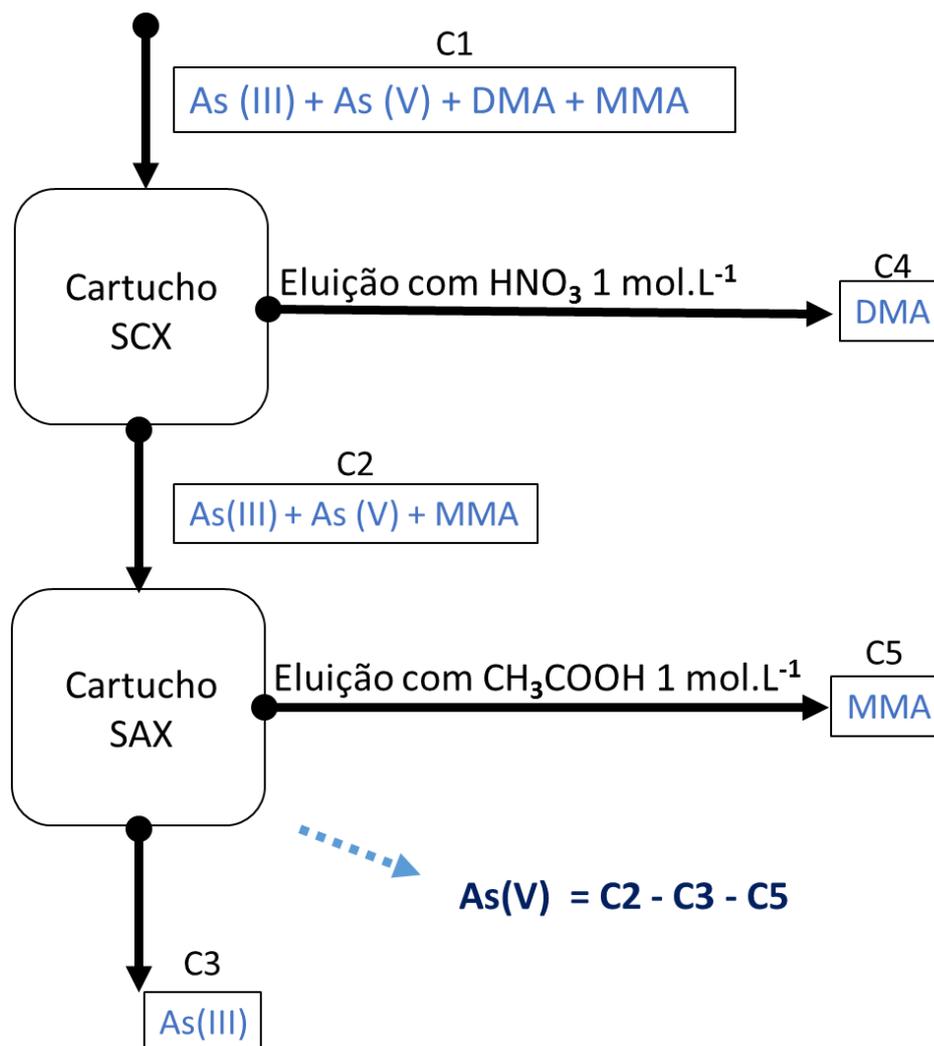


FIGURA 2 – Esquema representando o método desenvolvido para especiação de Arsênio utilizando cartuchos de SPE.

FONTE: modificado de Chunhai Yu et al., 2003.

Nota: SCX: troca catiônica forte. SAX troca aniônica forte.

Como observado na FIGURA 2, em uma primeira etapa foi realizada a extração da amostra no cartucho de troca catiônica (SCX), onde fica retido o DMA. As demais espécies de interesse As (III), As (V) e MMA passam no cartucho e são coletadas. A eluição do DMA retido no cartucho de troca catiônica foi realizada com ácido nítrico 1,0 mol l<sup>-1</sup>. Com isso, se obteve o DMA isolado.

A partir da amostra coletada na primeira extração foi realizada a segunda extração utilizando o cartucho de troca aniônica (SAX). Nessa segunda etapa, no cartucho ficam retidas as espécies As (V) e MMA. O As

(III) não fica retido e pode ser coletado isolado. Dentre as espécies retidas no cartucho de troca aniônica, o MMA foi eluído com ácido acético  $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ .

Nas soluções contendo as espécies já isoladas (C3, C4 e C5 na FIGURA 2) foi realizada a determinação de As total e se obteve a quantificação de As (III), MMA e DMA. A quantificação de As (V) foi obtida subtraindo da concentração de As quantificada na solução de entrada do cartucho de troca aniônica (C2 na FIGURA 2) as concentrações obtidas de As (III) (C3 na FIGURA 2) e MMA (C5 na FIGURA 2).

Antes da extração nos dois cartuchos, o pH das amostras foi ajustado para 5,6 utilizando uma solução de ácido nítrico e/ou hidróxido de amônio  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ . A escolha desse pH foi baseada nos resultados de Chunhai Yu et al. (2003), que determinaram esse valor de pH como ideal para retenção seletiva das espécies de As.

O condicionamento dos cartuchos e percolação da amostra nas duas etapas de extração foram realizados com os seguintes passos sequenciais:

1. Percolação de 5 ml de etanol;
2. Percolação de 5 ml de água deionizada;
3. Percolação de 5 ml de água deionizada com pH ajustado para 5,6;
4. Percolação de 10 ml da amostra com pH ajustado para 5,6.

Foram testados quatro cartuchos de troca iônica, sendo dois de troca catiônica e dois de troca aniônica. Os cartuchos são fabricados pela empresa Kopp Technologies localizada no município de São Carlos - SP. As FIGURA 3 e FIGURA 4 representam os cartuchos de troca catiônica e

troca aniônica, respectivamente, escolhidos para avaliação e os grupos funcionais presentes em suas resinas.

### Cartuchos de troca catiônica

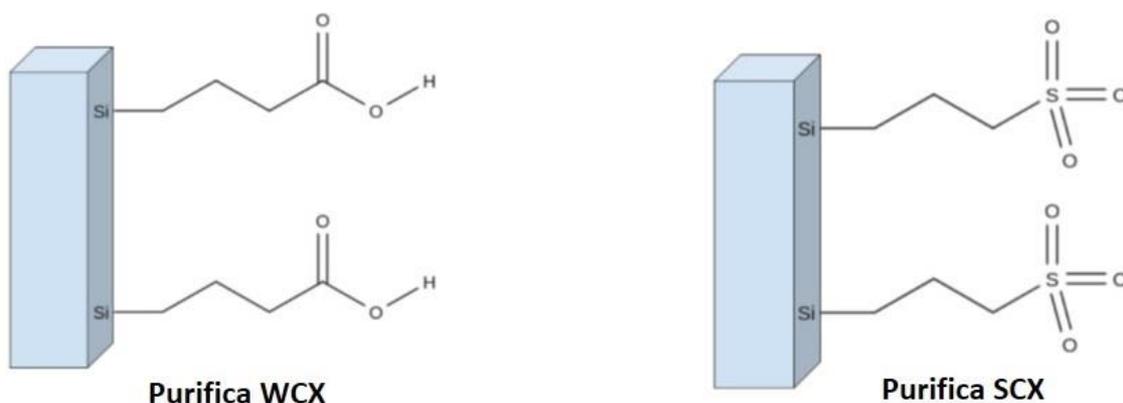


FIGURA 3 – Grupos funcionais dos cartuchos de troca catiônica

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).

### Cartuchos de troca aniônica

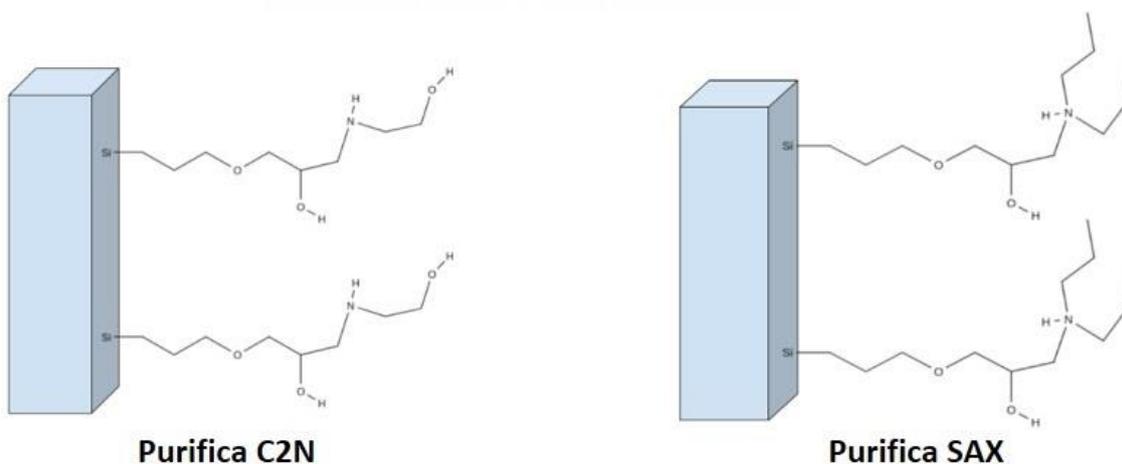


FIGURA 4 – Grupos funcionais dos cartuchos de troca aniônica

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).

Os cartuchos de troca catiônica selecionados para avaliação foram o Purifica WCX e o Purifica SCX. O WCX apresenta grupos ácido carboxílico alifáticos unidos à superfície do material, possui pKa de cerca de 4,8 e é considerado um trocador catiônico fraco. Já o SCX tem na superfície do material o grupo sulfopropil que é extremamente ácido com

valor de pKa extremamente baixo ( $<1,0$ ) e é considerado um trocador catiônico forte.

Os cartuchos de troca aniônica selecionados para avaliação foram o Purifica C2N e o Purifica SAX. O C2N é uma resina cromatográfica que possui uma alta densidade de aminas secundárias carregadas positivamente, é altamente hidrofílico e é considerado um trocador aniônico fraco com pKa de 9,8. Já o SAX é uma resina que contém alta densidade de aminas terciárias carregadas positivamente, é moderadamente hidrofílico, possui pKa elevado e é considerado um trocador aniônico forte.

A FIGURA 5 apresenta alguns exemplares dos cartuchos de fabricação nacional utilizados nos ensaios.



FIGURA 5 – Cartuchos SPE de fabricação nacional utilizados nos ensaios  
FONTE: elaborado pelo autor.

A FIGURA 6 apresenta o sistema *manifold* com bomba a vácuo utilizado para extração em fase sólida em cartuchos.



FIGURA 6 – Sistema *manifold* para extração em fase sólida com cartuchos  
FONTE: elaborado pelo autor.

### 4.3 Extração e separação das espécies de arsênio em tecido de peixe

Para extração das espécies de As de amostras de peixe foi desenvolvido um procedimento de extração com solventes, sonicador ultrassônico e centrifugação. O desenvolvimento do método foi baseado nos trabalhos de Nogueira et al. (2018) e Zheng e Hintelmann (2004), que utilizaram uma mistura de solventes água/metanol 1:1 v/v e realizaram extrações sequenciais em ultrassom e centrifugação dos extratos.

Para a realização da extração foram pesados aproximadamente 1,0 g de amostra retirada da musculatura dorsal do peixe em um béquer de

50 ml. As amostras foram fortificadas com 1 ml de solução padrão contendo as espécies de As, a fim de se obter a concentração desejada considerando que o volume final do extrato é de 10 ml.

A amostra ficou em repouso por uma hora para interação das espécies de As com o tecido de peixe. Passado esse período, foi adicionado ao béquer 10 ml de uma mistura água/metanol (1:1; v/v) e, posteriormente, o recipiente foi levado ao sonicador ultrassônico da marca Ultronique, modelo QR500 (FIGURA 7), por três minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 minutos em 4000 rpm. Após a centrifugação, o conteúdo líquido sobrenadante foi separado em um *vial*. A amostra foi submetida novamente ao mesmo processo utilizando 10 ml de água/metanol 1:1 v/v, três minutos de sonicador e 15 minutos de centrífuga.



FIGURA 7 – Sonicador Ultrassônico, Ultronique QR 500, potência *ultrassônica* 500 watts.

FONTE: elaborado pelo autor.

Os dois extratos obtidos foram misturados e levados ao sistema de concentração (FIGURA 8). Esse sistema é composto por um banho-maria onde os extratos são evaporados com auxílio de gás nitrogênio. A amostra foi mantida a 45 °C para evaporação do solvente orgânico (metanol) e obtenção de aproximadamente 10 ml de extrato, que foram avolumados em balão de 10 ml.



FIGURA 8 – Sistema de concentração composto por um banho-maria associado a um sistema de vácuo e recuperação de solvente por condensação.

FONTE: elaborado pelo autor.

Após a extração, o extrato final aquoso foi submetido à separação das espécies de As extraídas das amostras de peixe. A separação foi realizada pelo mesmo método de extração em fase sólida para água descrito no item 4.2.

#### 4.4 Determinação de arsênio total

A quantificação de As foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O equipamento utilizado foi um ICP-OES modelo Avio 200, marca PerkinElmer (FIGURA 9), utilizando argônio de alta pureza como gás de formação do plasma.



FIGURA 9 – ICP-OES PerkinElmer AVIO 200.  
FONTE: elaborado pelo autor.

As alíquotas contendo as espécies de As separadas foram quantificadas no método de As total no ICP-OES. O método para determinação de As total está validado e consta no escopo de acreditação da NBR ISO/IEC 17025. O método de referência utilizado foi o 3120B do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (BAIRD; EATON; RICE, 2017). O limite de quantificação é de  $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ .

Os resultados fornecidos no ICP-OES estão na unidade  $\text{mg l}^{-1}$ . Na análise de tecido de peixe, para obtenção do resultado em  $\text{mg kg}^{-1}$  foi necessário realizar o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração final (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\underline{C} \times \underline{V}}{M}$$

Onde:

C: concentração em  $\text{mg l}^{-1}$  obtida no ICP

V: volume final (ml) do extrato

M: massa (g) de peixe utilizada na extração

## 4.5 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados, tais como ácidos e solventes, foram de alto grau de pureza. A água ultrapura utilizada nos ensaios foi obtida de um aparelho de Osmose reversa da marca Quimis, modelo Q342-210. Todos os padrões analíticos e materiais de referência adquiridos são rastreáveis e com acreditação na norma ABNT ISO 17034:2017.

## 4.6 Validação dos métodos

As validações dos métodos desenvolvidos foram realizadas seguindo o procedimento para validação de metodologias vigente no laboratório Venturo. O procedimento tem como referências:

- NBR ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração. ABNT, Rio de Janeiro (Brasil), 2017.
- DOQ-CGCRE-008 - Orientações sobre Validação de métodos analíticos, INMETRO, Rio de Janeiro (Brasil), revisão 08, abril de 2020.

A seguir há um resumo das diretrizes gerais que foram seguidas no processo de validação. O laboratório deve demonstrar que tem

condições de operar os métodos de maneira adequada dentro das condições específicas existentes nas instalações antes de implantá-los. Deve-se avaliar as condições e recursos necessários para a realização do processo de validação. Os parâmetros analisados no processo de validação foram: precisão, exatidão e tendência, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e curva analítica.

- Curva Analítica

A curva analítica de cada composto de interesse deve ser elaborada com no mínimo cinco níveis de concentrações diferentes. Quando possível, as concentrações dos pontos devem ser baseadas no limite máximo permitido (LMP). No caso das espécies de As, não há valores de LMP definidos para matrizes ambientais. Inicialmente a base foi a faixa de trabalho do As total.

Cada ponto da curva foi injetado em triplicata, e a média para cada nível foi calculada. Os dados foram plotados em um gráfico de intensidade do sinal (eixo  $y$ ) em função da concentração do analito (eixo  $x$ ). Por fim, foi modelada a regressão linear da curva analítica, cujo coeficiente de determinação deve ser superior ou igual a 0,99.

- Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. As formas mais comuns de expressar a precisão de um método são repetibilidade e reprodutibilidade. O laboratório utiliza a repetibilidade como base para obtenção da precisão.

A repetibilidade foi avaliada em termos de testes estatísticos feitos em uma amostra já analisada. Foram preparadas três diferentes concentrações da faixa de uso do método – baixa (P1), média (P2) e alta (P3).

As três soluções (P1, P2 e P3) foram injetadas em triplicata e o desvio padrão relativo (RSD) foi obtido a partir de:

$$RSD = \frac{s}{\bar{X}} \times 100\%$$

Onde:

$\bar{X}$  = média das replicatas;

$s$  = desvio padrão.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Onde:

$X_i$  = resultado da  $i$ -ésima replicata;

$\bar{X}$  = média das replicatas;

$n$  = número de replicatas avaliadas;

$s$  = desvio padrão.

O valor aceitável para cada ensaio do RSD deve ser menor ou igual a quinze por cento ( $RSD \leq 15\%$ ).

- Exatidão e Tendência

O mecanismo para se determinar a exatidão e a tendência de um método pode incluir o uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais ou realização de ensaios de recuperação. O laboratório utiliza a recuperação como base para obtenção da exatidão.

Na análise de recuperação foram preparadas três diferentes concentrações da faixa de uso do método – baixa (P1), média (P2) e alta (P3). Também foi preparado um branco (P0) não fortificado. As quatro soluções (P0, P1, P2 e P3) foram então injetadas em triplicata.

Foi calculada a média das concentrações das amostras fortificadas. O valor médio da amostra não fortificada (branco) foi descontado das amostras fortificadas. Dessa forma, foi calculada a recuperação em cada nível:

$$\text{recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

Onde:

$C_1$  = Concentração determinada na amostra fortificada;

$C_2$  = Concentração determinada na amostra não fortificada;

$C_3$  = Concentração fortificada.

O critério para aceitação da recuperação é o intervalo de 80% a 120%.

- Limite de Detecção

Para a determinação do limite de detecção (LD) foram analisadas sete réplicas de uma amostra fortificada com solução padrão diluída no nível mínimo (P1) da curva analítica. Este nível foi escolhido

pois apresenta, teoricamente, a maior dispersão entre os dados. Foram preparadas sete réplicas da amostra fortificada com solução padrão P1 em um único dia e cada solução foi injetada uma única vez.

Para o cálculo do LD:

$$LD = t_{(n-1, \nu)} * s$$

Onde:

LD = Limite de detecção do método para a matriz testada

$t_{(n-1, \nu)}$  = Valor de  $t$  de Student para  $n-1$  graus de liberdade e  $\nu$  grau de confiança (99%).

$s$  = desvio padrão das sete replicatas.

- Limite de quantificação

Para a determinação do limite de quantificação (LQ) foram analisadas sete réplicas de uma amostra fortificada com solução padrão diluída no nível mínimo (P1) da curva analítica. Utilizando os mesmos dados produzidos no parâmetro LD, o LQ foi calculado:

$$LQ = 10*s$$

Onde:

LQ = Limite de quantificação do método para a matriz testada (deve ser informada).

$s$  = desvio padrão das sete replicatas.

### 4.6.1 Cálculo de incerteza

Dentro do processo de validação das metodologias foi realizado o cálculo de incerteza para os ensaios seguindo o procedimento vigente no laboratório Venturo. O procedimento tem como referências:

- RM 68 – Guia Prático do Avaliador de Laboratório – Incerteza de Medição, revisão 05, Rede metrológica, Rio Grande do Sul (Brasil), 2013.
- DOC-CGCRE-019 – Exemplos de estimativa de medição ensaios químicos, revisão 04, INMETRO, Rio de Janeiro (Brasil), abril de 2019.
- ISO GUM 95 – A Estimativa da Incerteza de medição pelos métodos do ISO GUM 95 e de simulação de Monte Carlo
- NBR ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração. ABNT, Rio de Janeiro (Brasil), 2017.
- Guia Eurachem/ CITAC – Determinando a incerteza na medição analítica, segunda edição, 2002.

O processo de estimativa de incerteza de medição pode ser resumido em quatro etapas (FIGURA 10).

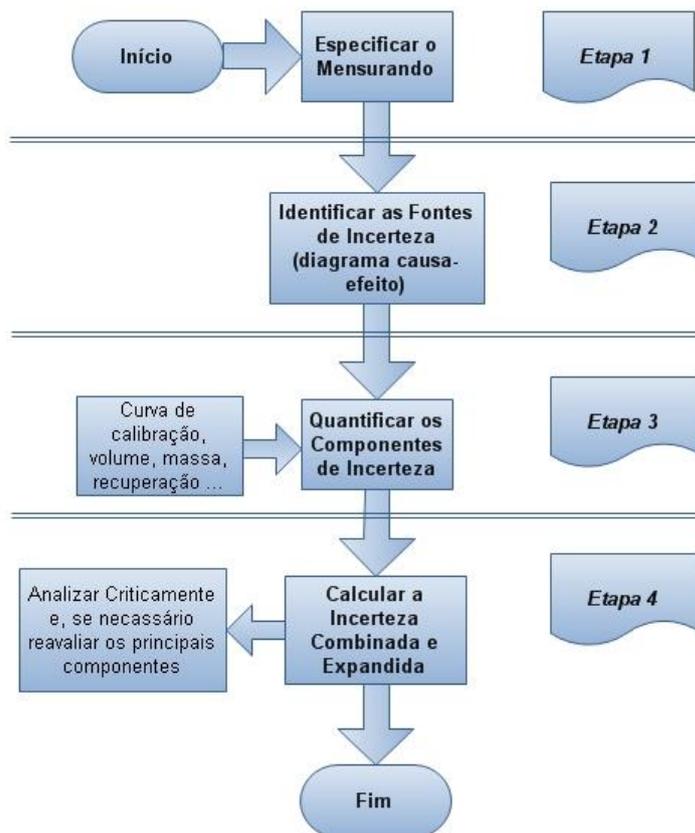


FIGURA 10 – Fluxograma do procedimento para cálculo de incerteza

### *Etapa 1 – Especificar o Mensurando*

Para as análises realizadas no laboratório, o mensurando, i.e., o objeto da medição, corresponde a diversas matrizes e concentrações de analitos.

### *Etapa 2 – Identificar as Fontes de Incerteza*

Nesta fase foi necessário realizar um levantamento de todas as fontes de incerteza relevantes para o método analítico. Este levantamento de fontes pode ser realizado pelo diagrama de “causa e efeito” (FIGURA 11).

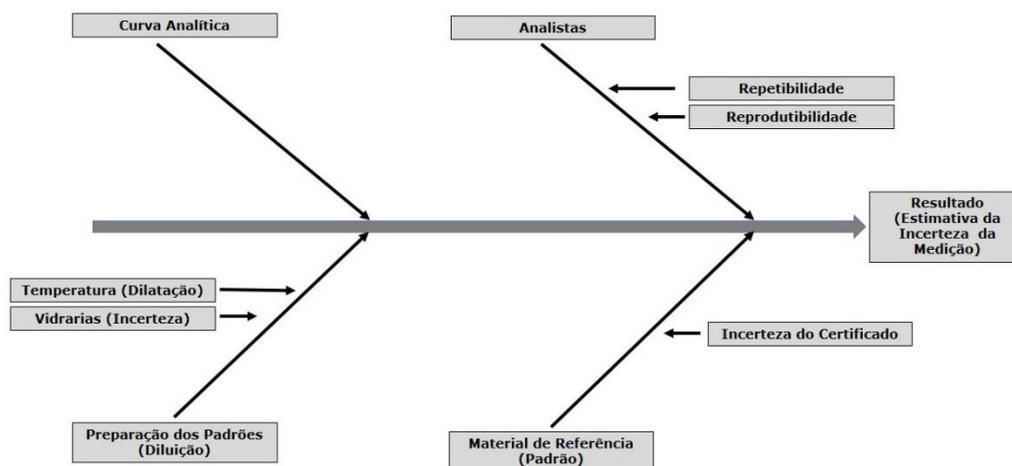


FIGURA 11 – Diagrama de “causa efeito” para cálculo de incerteza em análises cromatográficas e espectrofotométricas.

FONTE: Venturo Análises Ambientais (2018)

### *Etapa 3 – Quantificar os Componentes de Incerteza*

Foram considerado os seguintes aspectos relevantes:

- a) Incerteza da curva analítica de calibração;
- b) Incerteza da Precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade);
- c) Incerteza da Diluição;
- d) Incerteza dos Padrões;

### *Etapa 04 – Cálculo da Incerteza Padrão Combinada e Expandida*

A Incerteza Padrão Combinada é a relação entre todas as componentes de incerteza padrão. A incerteza expandida é a incerteza obtida a partir da multiplicação da incerteza padrão por uma constante  $k$ , denominada fator de abrangência. Tal incerteza está relacionada com 95,45% de resultado mais provável, caso o valor de  $k$  seja igual a 2.

Todos os cálculos foram realizados em planilhas ou formulários eletrônicos já padronizadas onde os dados brutos são plotados.

## 5. Resultados e discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados dos testes de retenção seletiva das espécies de As nos quatro cartuchos propostos (WCX, SCX, C2N e SAX), assim como os resultados da especiação das espécies de As (As (III), As (V), MMA e DMA) em água e tecido de peixe realizada nos cartuchos selecionados (SCX e SAX) a partir dos testes de retenção. Por fim, serão apresentados os resultados da validação dos métodos desenvolvidos realizada seguindo o documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2020).

### 5.1 Retenção seletiva das espécies de arsênio

A primeira etapa para o desenvolvimento do método proposto foi testar a retenção seletiva das espécies de As de interesse nos cartuchos SPE. Foi necessário encontrar uma resina de troca catiônica capaz de reter apenas a espécie DMA e uma resina de troca aniônica capaz de reter apenas as substâncias As (V) e MMA. Isso considerando o condicionamento dos cartuchos propostos e principalmente percolando as amostras com pH ajustado em 5,6.

Para determinar a capacidade de retenção das resinas, todas as espécies de As, de forma isolada, foram percoladas em todos os cartuchos propostos. Para isso, foram percolados nos cartuchos 10 ml de solução padrão contendo 0,500 mg l<sup>-1</sup> (As) da espécie de As a ser avaliada. O teste em cada cartucho foi realizado em triplicata para todas as espécies de As.

Os diagramas esquemáticos abaixo exemplificam os testes de retenção realizados com os cartuchos SPE. A FIGURA 12 demonstra os resultados obtidos dos ensaios em triplicata realizados com cartucho de troca catiônica WCX para retenção da espécie DMA. A FIGURA 13 ilustra

os ensaios realizados com o cartucho de troca catiônica SCX também para retenção da espécie DMA. Nesse ensaio, para determinar a quantidade de espécie retida na resina, subtraiu-se da concentração da amostra inicial a concentração de As na amostra que sai do cartucho (efluente).

Ressalta-se que a quantificação foi realizada por determinação do As total nas amostras por ICP-OES, portanto, as espécies já isoladas foram quantificadas em função da concentração de As total.

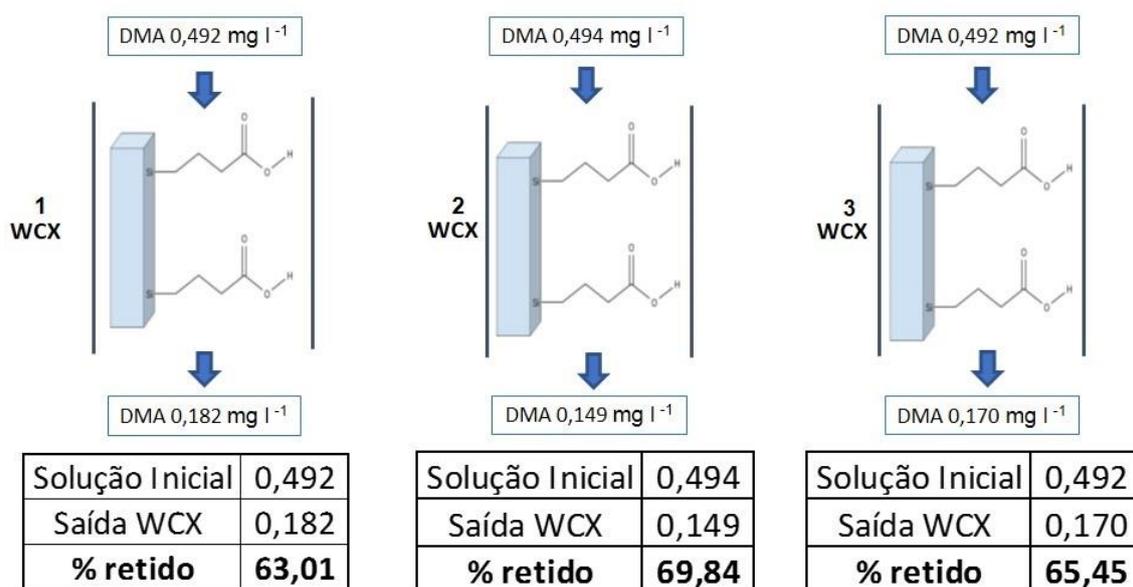
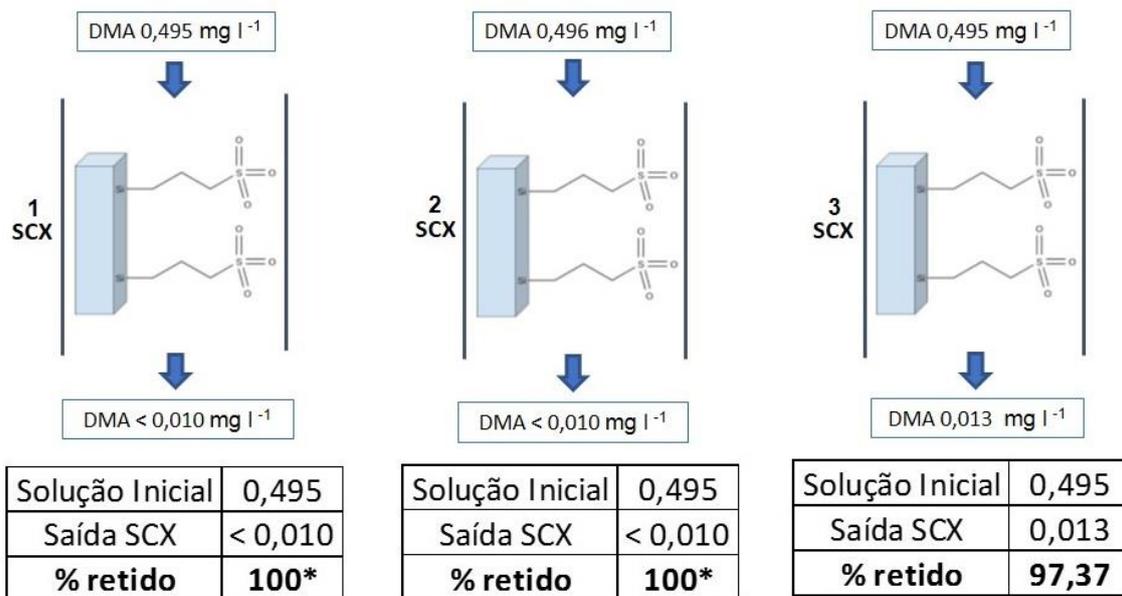


FIGURA 12 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do DMA no cartucho de troca catiônica WCX.

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).



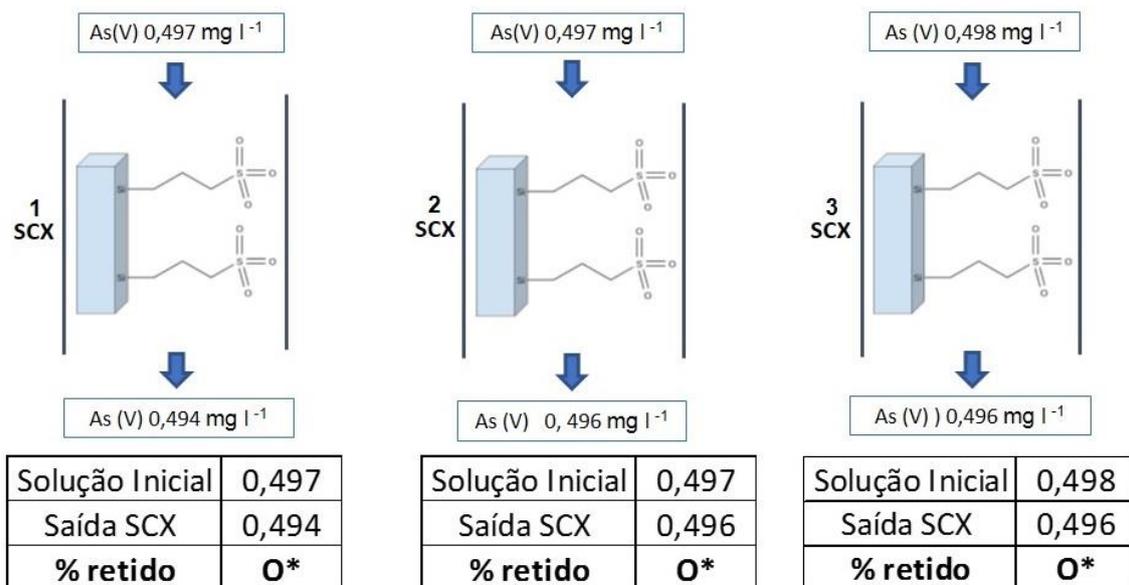
\* Os valores abaixo do limite de quantificação de As ( $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ ) foram considerados zero no cálculo da porcentagem

FIGURA 13 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do DMA no cartucho de troca catiônica SCX.

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).

Como demonstrado na FIGURA 12, a maior porcentagem de retenção do DMA obtida no cartucho WCX foi de 69,84%. Já nos ensaios com o cartucho SCX (FIGURA 13), a maior retenção observada foi de 100%, o que indica que a resina do SCX foi capaz de reter todo o DMA em dois ensaios da triplicata. É importante ressaltar que os valores quantificados na saída do cartucho que ficaram abaixo do limite de quantificação de As ( $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ ) foram considerados como zero no cálculo da porcentagem.

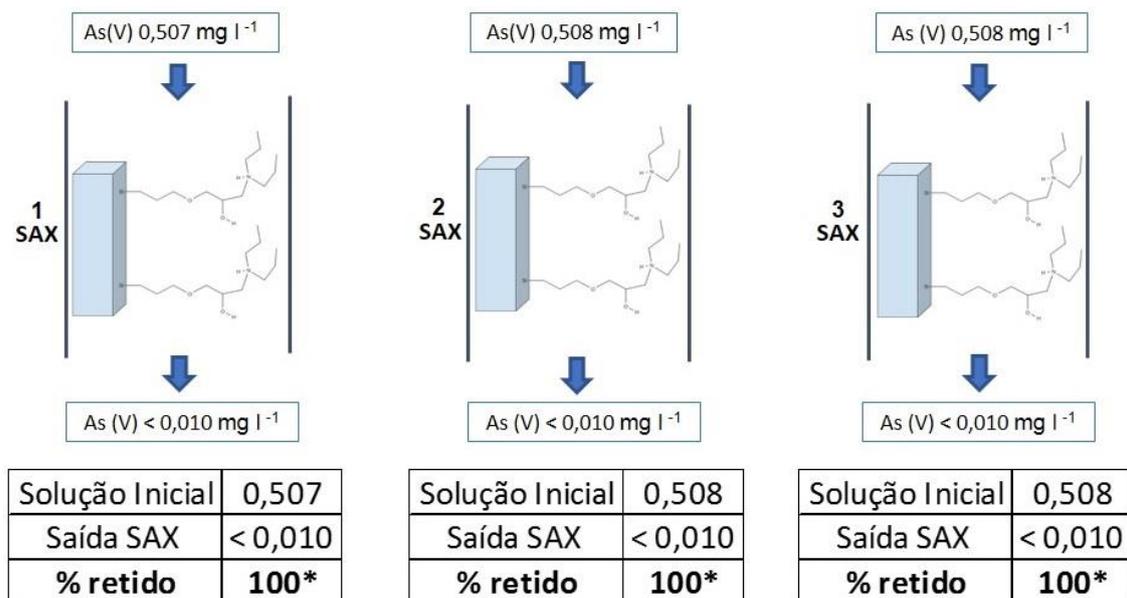
As FIGURA 14 e FIGURA 15 representam os resultados dos ensaios realizados em triplicata com As (V) no cartucho de troca catiônica SCX e no cartucho de troca aniônica SAX, respectivamente.



\* Quando a diferença entre a concentração inicial e a saída é menor do que o limite de quantificação de As ( $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ ), os valores foram considerados zero no cálculo da porcentagem

FIGURA 14 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do As (V) no cartucho de troca catiônica SCX.

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).



\* Os valores abaixo do limite de quantificação de As ( $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ ) foram considerados zero no cálculo da porcentagem

FIGURA 15 – Diagrama esquemático do ensaio realizado em triplicata para testar a retenção do As (V) no cartucho de troca aniônica SAX.

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).

Como demonstrado, o As (V) não ficou retido no cartucho SCX em nenhum dos ensaios. Já no cartucho de troca aniônica SAX, foi verificada uma taxa de 100% de retenção em todos os ensaios. Esses

resultados foram fundamentais para escolha das resinas e prosseguimento no desenvolvimento do método, já que o cartucho de troca catiônica é utilizado na primeira etapa de separação das espécies de As, em que o As (V) não deve ficar retido. Já na segunda etapa de separação, o As (V) deve ficar retido no cartucho de troca aniônica.

Os ensaios demonstrados nas FIGURAS 12 a 15 também foram realizados com as espécies As (III) e MMA tanto nos cartuchos de troca catiônica, como nos cartuchos de troca aniônica. As TABELA 1 e TABELA 2 resumem os resultados encontrados nos testes de retenção das quatro espécies de As de interesse realizados com os quatro cartuchos nacionais propostos para avaliação. Os resultados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de retenção das espécies nas análises realizadas em triplicata.

TABELA 1 – Percentual (%) de retenção das espécies de As nos cartuchos de troca catiônica.

<b>Cartucho SPE</b>	<b>As (III)</b>	<b>As (V)</b>	<b>DMA</b>	<b>MMA</b>
Purifica WCX	0	0	66,71 $\pm$ 3,5	0
Purifica SCX	0	0	99,12 $\pm$ 1,5	0

Nota: Os resultados representam a média com desvio padrão dos ensaios em triplicatas. Condições: 10 ml de solução contendo 0,500 mg l<sup>-1</sup> das espécies de As. pH = 5.6.

TABELA 2 – Percentual (%) de retenção das espécies de As nos cartuchos de troca aniônica.

<b>Cartucho SPE</b>	<b>As (III)</b>	<b>As (V)</b>	<b>DMA</b>	<b>MMA</b>
Purifica C2N	0	40,4 $\pm$ 3,6	17,4 $\pm$ 2,5	51,0 $\pm$ 5,7
Purifica SAX	0	100 $\pm$ 0	24,8 $\pm$ 3,7	100 $\pm$ 0

Nota: Os resultados representam a média com desvio padrão dos ensaios em triplicatas. Condições: 10 ml de solução contendo 0,500 mg l<sup>-1</sup> das espécies de As. pH = 5.6.

Esses resultados são muito similares aos observados nos estudos de retenção seletiva de Chunhai Yu et al. (2003), tanto no que se refere aos tipos de cartucho que apresentaram eficiência na retenção seletiva das espécies de As, como ao pH da matriz ajustado em 5,6. Chunhai Yu et al. (2003) investigaram o efeito do pH da amostra na

eficiência de retenção das espécies testando diferentes valores de pH (i.e., 3,5; 5,6 e 9,0), e encontraram que o pH 5,6 é o ideal para retenção seletiva das espécies de interesse tanto no cartucho de troca catiônica (SCX) como no de troca aniônica (SAX).

A retenção dos compostos depende de sua interação com a matriz e com a resina/sorbente da fase sólida. Isso envolve o pKa desses compostos e suas característica iônicas, bem como interações hidrofóbicas que podem ocorrer com a fase sólida (CHUNHAI YU et al., 2003; DAS; GUPTA; DAS, 2012).

O DMA, como já mencionado, foi retido com eficiência no cartucho de troca catiônica SCX (TABELA 1). Como observado e discutido por Chunhai Yu et al. (2003), essa seria a retenção mais complexa de se explicar entre as espécies estudadas. Em tese, em pH 5,6, o DMA seria uma espécie química não carregada. Provavelmente, a interação entre o DMA e o cartucho de troca catiônica SCX ocorre por uma forte interação secundária de caráter não polar e não apenas por interação iônica primária (CHUNHAI YU et al., 2003). O DMA ainda apresentou baixa retenção nos cartuchos de troca aniônica (TABELA 2), que poderia ser causado por uma desprotonação parcial do DMA em pH 5,6. Porém, isso não interfere no desenvolvimento do método de especificação, uma vez que o DMA fica retido no cartucho de troca catiônica, que é a primeira etapa do processo de separação das espécies.

O As (III) em pH 5,6 também é uma espécie não carregada, o que explica a não retenção em nenhum dos cartuchos testados (TABELA 1 e TABELA 2). Com valor de pKa = 9 o As (III) se mantém não dissociado em uma ampla faixa de pH.

Em pH 5,6, o As (V) e o MMA existem na forma de ânions, ou seja, carregados negativamente. Tanto o As (V) como o MMA foram

completamente retidos no cartucho de troca aniônica SAX, assim como observado por Chunhai Yu et al. (2003).

Outros trabalhos já utilizaram cartuchos de troca aniônica para separar apenas as espécies inorgânicas As (III) e As (V) em baixas concentrações. Sugár et al. (2013) e Le et al. (2000) utilizaram resina de troca aniônica forte para reter o As (V) e recolher o As (III) no efluente do cartucho, similarmente ao proposto neste trabalho e observado nos testes de retenção.

Em suma, os testes de retenção apontaram que, para o desenvolvimento do método proposto para especiação de As (item 4.2), deve-se utilizar o cartucho de troca catiônica SCX para retenção do DMA, e o cartucho SAX para retenção do MMA e As (V).

Os testes de retenção foram fundamentais para o início do trabalho e seleção dos cartuchos a serem utilizados. Porém, também foi necessário realizar a eluição do DMA retido no SCX e do MMA retido no SAX. O item 5.1.1 apresenta os resultados do teste de eluição seletiva das espécies.

### **5.1.1 Eluição das espécies de arsênio**

Para eluição do DMA retido nos cartuchos SCX foi utilizado ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )  $1 \text{ mol l}^{-1}$ , e para eluição do composto MMA do cartucho SAX foi utilizado ácido acético (HAc)  $1 \text{ mol l}^{-1}$ . Assim como nos testes de retenção, as análises foram realizadas em triplicatas. As TABELA 3 e TABELA 4 apresentam a média e desvio padrão das recuperações (%) obtidas na eluição do DMA e MMA, respectivamente.

TABELA 3 – Recuperação média obtida na eluição do DMA

<b>Eluente</b>	<b>DMA</b>
HNO <sub>3</sub> 1 mol l <sup>-1</sup>	100 ± 2,2

Nota: Os resultados representam a média com desvio padrão dos ensaios em triplicata. Eluição: 1,5 ml de HNO<sub>3</sub> 1 mol l<sup>-1</sup> seguido de 1,5 ml de HNO<sub>3</sub> 1 mol l<sup>-1</sup>

TABELA 4 – Recuperação média obtida na eluição do MMA

<b>Eluente</b>	<b>As (V)</b>	<b>MMA</b>
HAc 1 mol l <sup>-1</sup>	0*	98,7 ± 3,4

Nota: Os resultados representam a média com desvio padrão dos ensaios em triplicata. Eluição: 1,5 ml de HAc 1 mol l<sup>-1</sup> seguido de 1,5 ml de HAc 1 mol l<sup>-1</sup>.

\*valores abaixo do LQ de As foram considerados zero no cálculo da recuperação %

A eluição do DMA do cartucho SCX apresentou média de recuperação de 100%, enquanto a recuperação do MMA do cartucho SAX apresentou média de 98,7%. O ensaio também demonstrou que o uso do ácido acético 1 mol l<sup>-1</sup> na eluição do cartucho SAX não remove o As (V). Os resultados foram bastante satisfatórios e confirmaram o uso desses eluentes nesse método para separação das espécies de As utilizando extração em fase sólida como demonstrado por Chunhai Yu et al. (2003).

Embora esse trabalho tenha como objeto as espécies As (III), As (V), MMA e DMA, o método proposto por Chunhai Yu et al. (2003) envolve a especiação de mais quatro espécies de As. No cartucho de troca catiônica SCX poderiam ficar retidos com o DMA as espécies orgânicas arsenobetaina, arsenocolina e óxido de trimetilarsina (TMAO). Chunhai Yu et al. (2003), após avaliarem três tipos de eluentes, demonstraram que o HNO<sub>3</sub> 1 mol l<sup>-1</sup> foi capaz de eluir seletivamente apenas o DMA do cartucho SCX, enquanto o HAc 1 mol l<sup>-1</sup> removeu apenas o MMA do cartucho SAX. Por isso, era fundamental que esses eluentes funcionassem neste trabalho como forma de garantir a eluição seletiva das espécies de interesse.

## 5.2 Especificação de arsênio em água

Após os testes de retenção e eluição seletivas das espécies, foram selecionados os cartuchos SCX e SAX e os eluentes  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol l}^{-1}$  e  $\text{HAc}$   $1 \text{ mol l}^{-1}$  para realização do ensaio de especificação de As em água empregando extração em fase sólida como proposto na metodologia (item 4.2). Também ficou definido que o condicionamento dos cartuchos propostos e o ajuste de pH das amostras em 5,6 são eficientes para realização do método.

Para isso, foi preparada uma solução mix de padrões de 10 ml contendo  $0,500 \text{ mg l}^{-1}$  (As) de cada espécie de As, i.e., As (III), As (V), DMA e MMA, para realização do ensaio. O pH da amostra foi ajustado para 5,6, e o condicionamento dos cartuchos foi realizado seguindo a proposta metodológica no item 4.2. A FIGURA 16 apresenta o diagrama esquemático do ensaio realizado com as concentrações encontradas em  $\text{mg l}^{-1}$  de cada espécie.

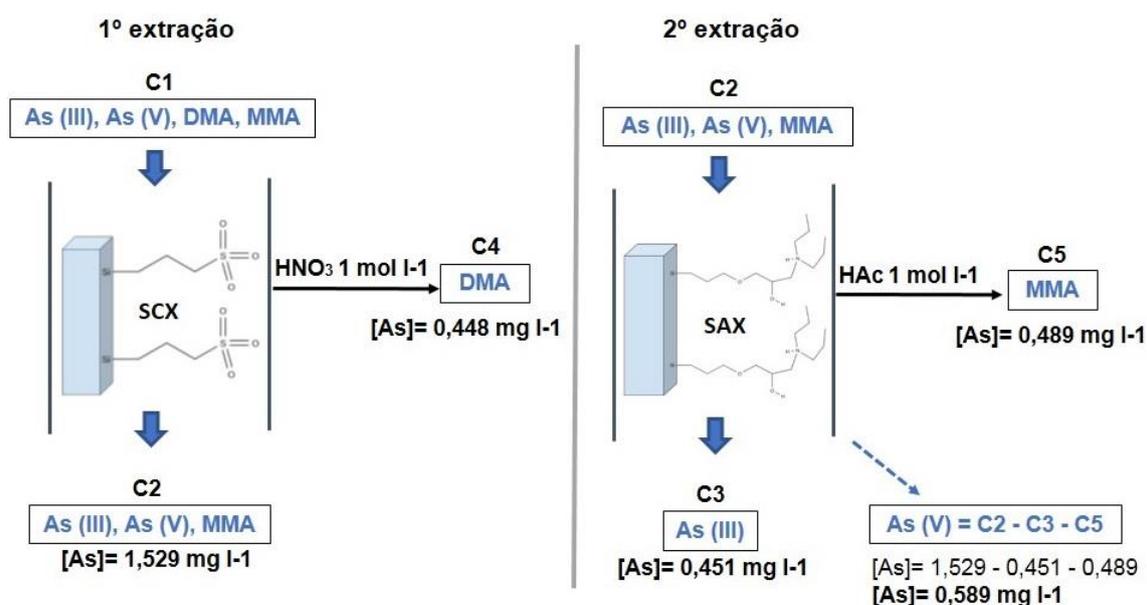


FIGURA 16 – Diagrama esquemático do ensaio de especificação de As em água.

FONTE: elaborado pelo autor a partir de Kopp Technologies (2023).

A TABELA 5 apresenta os resultados de concentração e recuperação de cada espécie encontrados na especificação de As em água.

TABELA 5 – Resultados da especificação de As em água utilizando extração em fase sólida.

<b>As (III)</b>		<b>As (V)</b>		<b>DMA</b>		<b>MMA</b>	
Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.
(mg l <sup>-1</sup> )	(%)	(mg l <sup>-1</sup> )	(%)	(mg l <sup>-1</sup> )	(%)	(mg l <sup>-1</sup> )	(%)
0,451	90,2	0,589	117,8	0,448	89,6	0,489	97,8

Nota: Condições: 10 ml de solução contendo 0,500 mg l<sup>-1</sup> das espécies de As. pH = 5.6.

Conc.: Concentração

Rec.: Recuperação

Como observado na TABELA 5, as recuperações das espécies de As obtidas com a aplicação do método foram muito satisfatórias, sendo que nenhuma das espécies apresentou recuperação fora da faixa de 80% a 120%.

Esses valores encontrados atendem a limites de recuperação estabelecidos na rotina do laboratório Venturo e também se assemelham aos obtidos por trabalhos com especificação de As encontrados na literatura. Chen et al. (2006), por exemplo, ao utilizar cromatografia iônica e determinação por ICP-MS encontraram recuperações de 96,4% para o DMA, 95,2% para o MMA e 103,1% para o As (V).

Os resultados demonstraram que é possível realizar com eficiência a especificação de As em água, considerando as espécies inorgânicas As (III) e As (V) e as espécies orgânicas DMA e MMA e empregando duas extrações em fase sólida sequenciais, sendo uma em cartucho de troca catiônica forte (SCX) e outra em cartucho de troca aniônica forte (SAX). Com isso, o método foi submetido à validação metodológica do laboratório e os resultados são apresentados no item 5.4.

### 5.3 Especificação de arsênio em tecido de peixe

A especificação de As em amostras sólidas, como tecidos de peixe, requer uma etapa adicional antes da separação das espécies. Como descrito no item 4.3, este trabalho propôs a extração das espécies de As do tecido de peixe utilizando uma mistura de solventes polares, ultrassom e centrifugação baseado nos trabalhos de Nogueira et al. (2018) e Zheng e Hintelmann (2004).

Após a fortificação da amostra de tecido de peixe com as espécies de As e a realização das etapas de extração, é obtido como produto final um extrato aquoso que contém as espécies de As extraídas da matriz. Conforme proposta metodológica deste trabalho, esse extrato foi submetido ao mesmo processo de separação das espécies de As utilizado para água. A FIGURA 17 apresenta o diagrama esquemático do ensaio de especificação de As realizado no extrato aquoso proveniente da extração do peixe.

Optou-se aqui por apresentar os resultados em  $\text{mg l}^{-1}$ . Esses são os valores obtidos nas leituras do ICP-OES, ou seja, não foi realizado a conversão em  $\text{mg kg}^{-1}$  para cálculo da recuperação e demonstração do funcionamento do método.

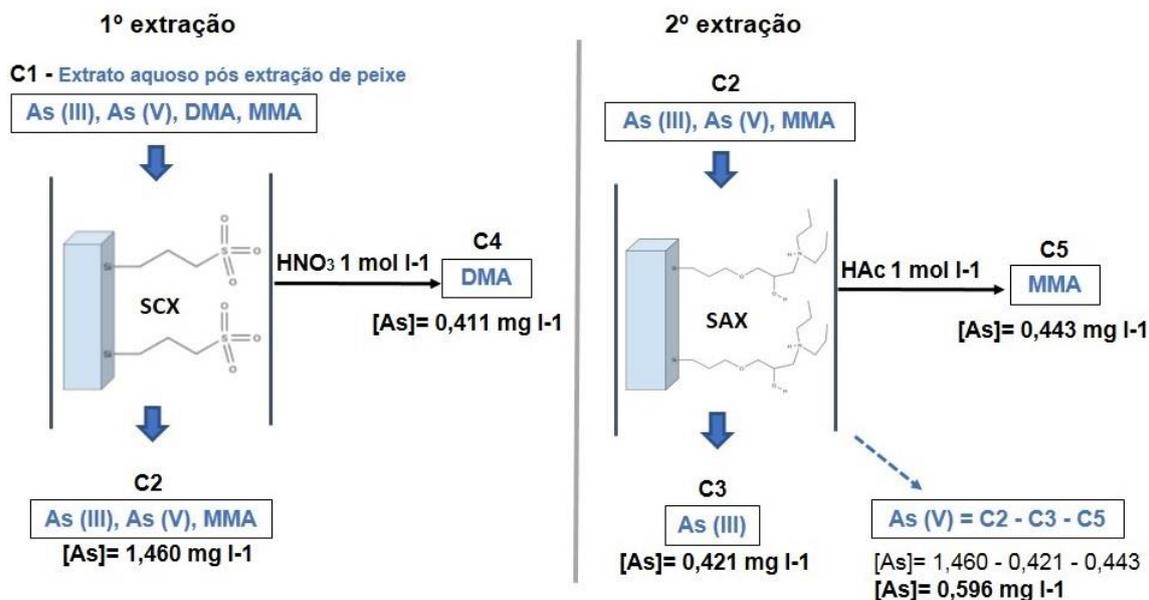


FIGURA 17 – Diagrama esquemático do ensaio de especiação de As em tecido de peixe

A TABELA 6 apresenta os resultados de concentração e recuperação de cada espécie obtidos na especiação de As em tecido de peixe.

TABELA 6 – Resultados da especiação de As em tecido de peixe utilizando extração em fase sólida.

As (III)		As (V)		DMA		MMA	
Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.
mg l <sup>-1</sup>	(%)	mg l <sup>-1</sup>	(%)	mg l <sup>-1</sup>	(%)	mg l <sup>-1</sup>	(%)
0,421	84,2	0,596	119,2	0,411	82,2	0,443	88,6

Nota: Condições: 10 ml de solução contendo 0,500 mg l<sup>-1</sup> das espécies de As. pH = 5.6.

Conc.: Concentração

Rec.: Recuperação

Assim como na especiação de As em água, os resultados foram bastante satisfatórios, com a recuperação variando dentro da faixa de 80% a 120%. Isso demonstra a eficiência do método de extração proposto e a possibilidade de aplicar no extrato aquoso, produto da extração, o mesmo método de separação das espécies de As empregado para água.

As recuperações obtidas são bastante similares às observadas em trabalhos que utilizaram mistura de solventes e ultrassom para extração

das espécies de As de tecidos de peixes e outras amostras biológicas. Nogueira et al. (2018) obtiveram recuperação de 98,7% de DMA em amostras de peixe fortificadas, e 76% em amostras de arroz fortificadas. No mesmo trabalho também foi obtido 93,4% de recuperação de MMA e 87,6% de As (V), ambos em peixe. Também empregando mistura metanol/água, ultrassom e centrifugação, Zheng e Hintelmann (2004) atingiram boa precisão e repetibilidade na determinação de espécies de As em amostras de peixe de água doce em um lago rico em As no Canadá.

Os resultados demonstraram que é possível realizar com eficiência a especiação de As em tecido de peixe, considerando as espécies inorgânicas As (III) e As (V) e as espécies orgânicas DMA e MMA, com extração das espécies com solventes metanol/água, ultrassom e centrifugação. E em sequência, fazendo a separação das espécies no extrato aquoso empregando duas extrações em fase sólida sequenciais, sendo uma em cartucho de troca catiônica forte (SCX) e outra em cartucho de troca aniônica forte (SAX). Com isso, o método foi submetido à validação metodológica do laboratório e os resultados são apresentados no item 5.5.

## **5.4 Validação do método de especiação de arsênio em água**

O método desenvolvido para especiação de As em água foi submetido à validação metodológica seguindo as normas da NBR ISO/IEC 17025 e documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2020). Serão apresentados os parâmetros de validação: curva analítica, limite de detecção e quantificação, recuperação e repetitividade.

### **5.4.1 Curva analítica**

Como já descrito, o método desenvolvido pelo presente trabalho realiza a quantificação das espécies de As, após a separação e isolamento das mesmas, em função da concentração do As total. Portanto, a única curva analítica construída no ICP-OES foi a de As total. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata sendo a média utilizada para traçar a curva.

A TABELA 7 apresenta os dados brutos obtidos no ICP-OES para construção da curva analítica de As total. A FIGURA 18 apresenta a curva analítica traçada com as médias das intensidades dos pontos injetados em triplicata.

TABELA 7 – Dados brutos para construção da curva analítica em triplicata do As total.

Concentração (mg l <sup>-1</sup> )	Intensidade			Média
	1	2	3	
0,010	11,2	8,5	9,8	9,833
0,050	118,7	173,0	159,9	150,533
0,100	331,7	323,2	360,1	338,333
0,500	1753,0	1714,4	1712,8	1726,733
1,000	3672,6	3661,5	3658,6	3664,233
2,000	7021,5	7150,0	7089,0	7086,833

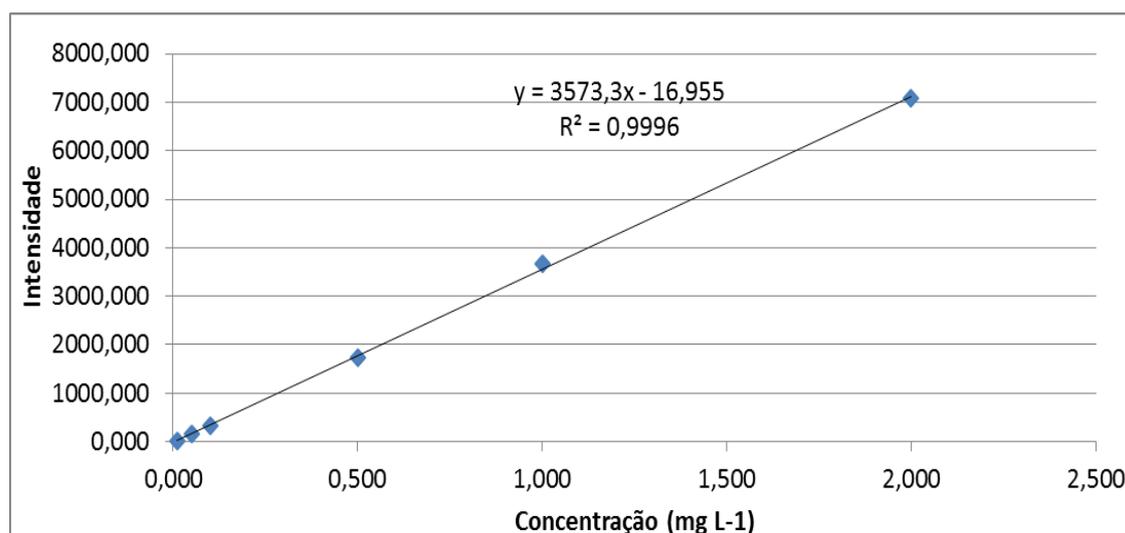


FIGURA 18 – Curva analítica de calibração do As total

A curva de calibração construída demonstrou linearidade satisfatória na faixa de trabalho proposta de 0,010 mg l<sup>-1</sup> a 2,000 mg l<sup>-1</sup>. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,9996, atendendo ao que o laboratório estabelece como aceitável como  $R^2 > 0,99$ .

#### 5.4.2 Limites de detecção e quantificação

Para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizados ensaios em sete réplicas de uma solução fortificada com 0,050 mg l<sup>-1</sup> de cada espécie de As (As (III), As (V), MMA e DMA). Como já descrito na metodologia, o LD é calculado ao multiplicar o desvio padrão ( $S$ ) por 3,143, que corresponde ao valor  $t$  unilateral considerando 99% de confiança e seis graus de liberdade. O LQ é calculado multiplicando o desvio padrão por 10.

A TABELA 8 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III). O limite de detecção calculado foi de 0,012 e o limite de quantificação foi de 0,040 mg l<sup>-1</sup>.

Concentração do analito (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio Padrão (S)	L.D. (mg.L <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg.L <sup>-1</sup> )
0,050	0,041	<b>0,00397612</b>	<b>0,012</b>	<b>0,040</b>
	0,047			
	0,040			
	0,051			
	0,043			
	0,048			
	0,044			

TABELA 8 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III) em água

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
0,050	0,041	0,004	0,012	0,040
	0,047			
	0,040			
	0,051			

---

0,043  


---

0,048  


---

0,044

---

Nota: LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

A TABELA 9 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ para o As (V). O limite de detecção calculado foi de 0,015 e o limite de quantificação foi de 0,047 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 9 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (V) em água

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
0,050	0,047	0,005	0,015	0,047
	0,043			
	0,046			
	0,039			
	0,053			
	0,040			
	0,044			

Nota: LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

A TABELA 10 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ para o DMA. O limite de detecção calculado foi de 0,012 e o limite de quantificação foi de 0,038 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 10 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do DMA.

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Resultado (mg l <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
0,050	0,044	0,0038	0,012	0,038
	0,041			
	0,048			
	0,038			
	0,047			
	0,044			
	0,039			

Nota: LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

A TABELA 11 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ para o MMA. O limite de detecção calculado foi de 0,015 e o limite de quantificação foi de 0,046 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 11 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do MMA

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Resultado (mg l <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
0,050	0,056	0,0046	0,015	0,046
	0,055			
	0,053			
	0,058			
	0,052			
	0,044			
	0,056			

Nota: LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

Com estes resultados o laboratório poderá reportar um valor de limite de quantificação de 0,050 mg l<sup>-1</sup> para cada espécie de As quantificada na especiação.

### 5.4.3 Recuperação e repetitividade

A recuperação do método, expressa em porcentagem, é a relação entre a concentração do analito de interesse encontrada na análise e a concentração teórica esperada na amostra. O teste de recuperação consiste na análise da matriz pura que foi dopada com concentrações conhecidas do analito de interesse. A razão entre a concentração determinada do analito e a concentração adicionada fornece o fator de recuperação.

Como já descrito na metodologia, a repetitividade foi utilizada como base para obtenção da precisão. Além do branco, foram analisados em triplicata três diferentes concentrações da faixa de trabalho do método e então realizado o cálculo de desvio padrão relativo (RSD, %) para cada ponto estudado.

A TABELA 12 apresenta os resultados obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade para o ensaio de As (III). A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 83,33%, 87,33% e 95,88% e do desvio padrão relativo foram 9,70%, 8,10% e 2,47%, respectivamente.

TABELA 12 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (III)

<b>Branco</b>	
<b>Replicatas</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	0,000
<b>2</b>	0,000
<b>3</b>	0,000
<b>Média:</b>	<b>0,000</b>
<b>Nível Baixo (fortificado) 0,050 mg l<sup>-1</sup></b>	
<b>Replicatas</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	0,041
<b>2</b>	0,046
<b>3</b>	0,038
<b>Média:</b>	<b>0,042</b>
<b>Desvio padrão:</b>	<b>0,004</b>
<b>Nível Médio (fortificado) 0,500 mg l<sup>-1</sup></b>	
<b>Replicatas</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	0,411
<b>2</b>	0,477
<b>3</b>	0,422
<b>Média:</b>	<b>0,437</b>
<b>Desvio padrão:</b>	<b>0,035</b>
<b>Nível Alto (fortificado) 2,000 mg l<sup>-1</sup></b>	
<b>Replicatas</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	1,896

	<b>2</b>		1,972
	<b>3</b>		1,885
		<b>Média:</b>	<b>1,918</b>
		<b>Desvio padrão:</b>	<b>0,047</b>
<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,04	83,33	9,70
0,50	0,44	87,33	8,10
2,00	1,92	95,88	2,47

A TABELA 12 exhibe todos os dados brutos obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade do As (III), de forma a demonstrar como a planilha de cálculo do laboratório funciona. Para os demais compostos serão apresentados diretamente os resultados da média de recuperação e desvio padrão relativo obtidos em cada ponto estudado.

A TABELA 13 apresenta os resultados obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade para o ensaio de As (V). A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 92,67%, 109,87% e 98,30%; e do desvio padrão relativo foram 11,08%, 6,79% e 7,35%, respectivamente.

TABELA 13 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (V)

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,05	92,67	11,08
0,50	0,55	109,87	6,79
2,00	1,97	98,30	7,35

Nota: Os resultados da recuperação e %RSD representam a média do ensaio em triplicata.

A TABELA 14 apresenta os resultados obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade para o ensaio de DMA. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 88,67%, 97,13% e 96,80%; e do desvio padrão relativo foram 7,92%, 1,13% e 2,28%, respectivamente.

TABELA 14 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de DMA

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,04	88,67	7,92
0,50	0,49	97,13	1,13
2,00	1,94	96,80	2,28

Nota: Os resultados da recuperação e %RSD representam a média do ensaio em triplicata.

A TABELA 15 apresenta os resultados obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade para o ensaio de MMA. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 94,67%, 100,60% e 108,35%; e do desvio padrão relativo foram 10,42%, 4,40% e 2,95%, respectivamente.

TABELA 15 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de MMA

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,05	94,67	10,42
0,50	0,50	100,60	4,40
2,00	2,17	108,35	2,95

Nota: Os resultados da recuperação e %RSD representam a média do ensaio em triplicata.

Para os ensaios realizados no setor de espectrometria, o laboratório define como aceitável uma faixa de recuperação de 80% a 120%. Como pode ser observado nos resultados, todas as espécies de As apresentaram recuperação dentro dessa faixa. O desvio padrão relativo estabelecido como aceitável é de  $\leq 15\%$ . Nesse caso, todas as espécies de As apresentaram %RSD menor do que 15%.

#### 5.4.4 Cálculo da incerteza

Como descrito na metodologia, o cálculo da incerteza do método envolve a quantificação da Incerteza Padrão Combinada e da Incerteza Expandida. A Incerteza Padrão Combinada relaciona todos os componentes de incerteza levantados como fontes de incerteza relevantes – Incerteza do Padrão comercial, Incerteza da Precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade), Incerteza da Curva Analítica, Incerteza da Diluição, e Incerteza da Amostragem. A incerteza expandida é obtida a partir da multiplicação da incerteza padrão por uma constante K ou fator de abrangência, que é igual a 2.

Os cálculos foram realizados em planilhas padronizadas onde foram plotados os dados brutos das análises. Os resultados serão apresentados em tabelas que resumem as planilhas de cálculo e que demonstram a contribuição em porcentagem de cada componente da incerteza, assim como a incerteza padrão combinada e incerteza expandida.

Como pode ser observado na TABELA 16, foi determinada uma incerteza expandida de 11,07% para o ensaio de As (III), tendo como principais fatores de contribuição a curva analítica (29,31%) e precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (52,70%).

TABELA 16 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (III) em água

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>UMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,0002	0,0023
<b>UIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	4,6364	52,7004
<b>UCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	2,5785	29,3090
<b>U Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,5805	17,9645
<b>U Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0239
<b>Incerteza Padrão Combinada (<math>u_{análise}</math>)</b>		<b>Incerteza</b>	<b>Unidade</b>

<b>Expandida (U)</b> <b>(Probabilidade de <math>\cong</math></b> <b>95%)</b>		
5,536	11,07	%

A TABELA 17 demonstra que foi determinada uma incerteza expandida de 12,58% para o ensaio de As (V), tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (63,25%) e a curva analítica (19,38%).

TABELA 17 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (V) em água

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>UMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,0149	0,1623
<b>UIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	5,8204	63,2569
<b>UCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	1,7833	19,3813
<b>U Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,5805	17,1767
<b>U Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0228
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>uanálise</i>)</b>		<b>Incerteza Expandida (U) (Probabilidade de <math>\cong</math> 95%)</b>	<b>Unidade</b>
6,289		12,58	%

Na TABELA 18 observa-se que foi determinada uma incerteza expandida de 10,47% para o ensaio de DMA, tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (54,15%) e a curva analítica (26,59%).

TABELA 18 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – DMA em água

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>UMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,010	0,121
<b>UIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	4,481	54,156

<b>UCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	2,201	26,597
<b>u Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,580	19,100
<b>u Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,002	0,025
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>Uanálise</i>)</b>		<b>Incerteza Expandida (<i>U</i>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
5,237		10,47	%

Foi determinada uma incerteza expandida de 11,61% para o ensaio de MMA (TABELA 19), tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (57,98%) e a curva analítica (23,96%).

TABELA 19 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – MMA em água

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>uMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,025	0,281
<b>uIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	5,161	57,980
<b>UCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	2,133	23,962
<b>u Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,580	17,754
<b>u Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,002	0,024
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>Uanálise</i>)</b>		<b>Incerteza Expandida (<i>U</i>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
5,804		11,61	%

## 5.5 Validação do método de especiação de arsênio em tecido de peixe

O método desenvolvido para especificação de As em tecido de peixe foi submetido à validação metodológica seguindo as normas da NBR ISO/IEC 17025 e documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2020). Serão apresentados os seguintes parâmetros de validação: curva analítica, limite de detecção e quantificação, recuperação e repetitividade.

### 5.5.1 Curva analítica

A curva analítica utilizada na determinação do As total foi a mesma construída para determinação dos ensaios em água. Assim, considera-se para validação a mesma curva apresentada para água no item 5.4.1.

### 5.5.2 Limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizada usando os mesmos procedimentos descritos para o ensaio para água (item 5.4.2). Optou-se aqui por apresentar os resultados em  $\text{mg l}^{-1}$ . Esses são os valores obtidos nas leituras do ICP-OES, ou seja, não foi realizado a conversão em  $\text{mg kg}^{-1}$  para utilização nos cálculos e demonstração da validação do método.

A TABELA 20 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III) no ensaio em tecido de peixe. O limite de detecção calculado foi de 0,013 e o limite de quantificação foi de 0,042  $\text{mg l}^{-1}$ .

TABELA 20 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (III) em peixe

Concentração do analito ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Concentração	Desvio Padrão (S)	L.D. ( $\text{mg l}^{-1}$ )	L.Q. ( $\text{mg l}^{-1}$ )
0,050	$\frac{0,047}{0,040}$	0,0042	0,013	0,042

0,041
0,052
0,044
0,046
0,042

A TABELA 21 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (V) no ensaio em tecido de peixe. O limite de detecção calculado foi de 0,013 e o limite de quantificação foi de 0,040 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 21 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do As (V) em peixe

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio Padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
	0,048			
	0,051			
	0,045			
0,050	0,041	0,0040	0,013	0,040
	0,051			
	0,045			
	0,042			

A TABELA 22 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do DMA no ensaio em peixe. O limite de detecção calculado foi de 0,012 e o limite de quantificação de 0,037 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 22 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do DMA em peixe

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio Padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
	0,040			
	0,043			
	0,046			
0,050	0,041	0,0037	0,012	0,037
	0,037			
	0,043			
	0,048			

A TABELA 23 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do MMA no ensaio em peixe. O limite de detecção calculado foi de 0,014 e o limite de quantificação foi de 0,045 mg l<sup>-1</sup>.

TABELA 23 – Resultados obtidos para os cálculos de LD e LQ do MMA em peixe

Concentração do analito (mg l <sup>-1</sup> )	Concentração	Desvio Padrão (S)	L.D. (mg l <sup>-1</sup> )	L.Q. (mg l <sup>-1</sup> )
	0,044			
	0,041			
	0,048			
0,050	0,045	0,0045	0,014	0,045
	0,040			
	0,043			
	0,053			

A partir desses resultados pode-se reportar um valor de limite de quantificação de 0,050 mg l<sup>-1</sup> para cada espécie de As quantificada na especiação. Como se trata de uma amostra sólida, a conversão de unidade foi feita seguindo o cálculo da metodologia descrita no item 4.4. Considerando um grama (1 g) de amostra utilizada e volume final do extrato de 10 ml, pode-se reportar um LQ de 0,500 mg kg<sup>-1</sup> para cada espécie de As quantificada no ensaio de especiação.

### 5.5.3 Recuperação e repetitividade

A TABELA 24 apresenta os resultados obtidos para o cálculo de recuperação e repetitividade para o ensaio de As (III) em peixe. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram,

respectivamente, 84,00%, 88,13% e 101,68%; e do desvio padrão relativo foram 8,58%, 9,83% e 10,04%, respectivamente.

TABELA 24 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (III) em peixe

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,04	84,00	8,58
0,50	0,44	88,13	9,83
2,00	2,03	101,68	10,04

Nota: Os resultados da recuperação e %RSD representam a média do ensaio em triplicata.

A TABELA 25 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de recuperação e repetitividade para o ensaio de As (V) em peixe. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 94,00 %, 90,33 % e 97,30 % e do desvio padrão relativo 11,85%, 9,42 % e 7,20 %, respectivamente.

TABELA 25 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de As (V) em peixe

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,05	94,00	11,85
0,50	0,45	90,33	9,42
2,00	1,95	97,30	7,20

Nota: Os resultados da recuperação e %RSD representam a média do ensaio em triplicata.

Na TABELA 26 encontram-se os resultados obtidos para os cálculos de recuperação e repetitividade para o ensaio de DMA em peixe. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 86,00%, 93,60% e 97,08% e do desvio padrão relativo 6,98%, 10,94% e 8,09%, respectivamente.

TABELA 26 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de DMA em peixe

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,04	86,00	6,98
0,50	0,47	93,60	10,94
2,00	1,94	97,08	8,09

A TABELA 27 apresenta os resultados obtidos para os cálculos de recuperação e repetitividade para o ensaio de MMA em peixe. A média das recuperações observadas nos níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, 88,67%, 95,07% e 94,30% e do desvio padrão relativo foram 7,92%, 5,82% e 4,43%, respectivamente.

TABELA 27 – Resultados obtidos para o cálculo de Recuperação e Repetitividade do ensaio de MMA em peixe

<b>Concentração Adicionada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Encontrada (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>Repetitividade (% RSD)</b>
0,05	0,04	88,67	7,92
0,50	0,48	95,07	5,82
2,00	1,89	94,30	4,43

#### 5.5.4 Cálculo da incerteza

A TABELA 28 demonstra que foi determinada uma incerteza expandida de 14,99% para o ensaio de As (III) em peixe, tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (62,04%) e a curva analítica (23,45%).

TABELA 28 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (III) em peixe.

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>UMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,0199	0,1802
<b>UIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	6,8532	62,0360
<b>UCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	2,5914	23,4580

<b>u Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,5805	14,3067
<b>u Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0190
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>U</i>análise)</b>		<b>Incerteza Expandida (<i>U</i>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
7,495		14,99	%

Para o ensaio de As (V) em peixe (TABELA 29) foi determinada uma incerteza expandida de 14,24%, tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (65,67%) e a curva analítica (18,72%).

TABELA 29 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – As (V) em peixe

<b>Fontes de Incerteza</b>	<b>Componentes da Incerteza</b>	<b>Incerteza Padrão (<math>u_i</math>)</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>uMRC</b>	Incerteza do Padrão Comercial	0,0018	0,0181
<b>uIntermediária</b>	Incerteza da precisão Intermediária	6,6741	65,6792
<b>uCA</b>	Incerteza da Curva Analítica	1,9032	18,7288
<b>u Diluição</b>	Incerteza da Diluição	1,5805	15,5532
<b>u Amostragem</b>	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0207
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>U</i>análise)</b>		<b>Incerteza Expandida (<i>U</i>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
7,118		14,24	%

A TABELA 30 demonstra que foi determinada uma incerteza expandida de 16,91% para o ensaio de DMA em peixe, tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (67,52%) e a curva analítica (19,02%).

TABELA 30 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – DMA em peixe

Fontes de Incerteza	Componentes da Incerteza	Incerteza Padrão ( $u_i$ )	Contribuição (%)
UMRC	Incerteza do Padrão Comercial	0,0100	0,0844
UIntermediária	Incerteza da precisão Intermediária	7,9966	67,5241
UCA	Incerteza da Curva Analítica	2,2534	19,0280
U Diluição	Incerteza da Diluição	1,5805	13,3457
U Amostragem	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0177
<b>Incerteza Padrão Combinada (<math>U_{análise}</math>)</b>		<b>Incerteza Expandida (<math>U</math>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
8,457		16,91	%

Para o ensaio de MMA em peixe foi obtida (TABELA 31) uma incerteza expandida de 13,07%, tendo como principais fatores de contribuição a precisão intermediária (Repetibilidade + Reprodutibilidade) (60,31%) e a curva analítica (23,28%).

TABELA 31 – Resultado da Incerteza Padrão Combinada e Expandida – MMA em peixe

Fontes de Incerteza	Componentes da Incerteza	Incerteza Padrão ( $u_i$ )	Contribuição (%)
UMRC	Incerteza do Padrão Comercial	0,0250	0,2550

<b>u</b> Intermediária	Incerteza da precisão Intermediária	5,9132	60,3145
<b>u</b> CA	Incerteza da Curva Analítica	2,2832	23,2882
<b>u</b> Diluição	Incerteza da Diluição	1,5805	16,1208
<b>u</b> Amostragem	Incerteza padrão combinada na Amostragem	0,0021	0,0214
<b>Incerteza Padrão Combinada (<i>u</i>análise)</b>		<b>Incerteza Expandida (<i>U</i>) (Probabilidade de <math>\cong 95\%</math>)</b>	<b>Unidade</b>
6,533		13,07	%

Verifica-se que o ensaio para especificação de As em tecido de peixe apresentou incerteza expandida superior para todas as espécies em relação ao ensaio em água. Esse resultado já era esperado, visto que trata-se de uma matriz mais complexa e que envolve um passo a mais no preparo da amostra, ou seja, a extração das espécies do tecido de peixe.

## 6. Conclusão

Considerando a crescente demanda por ensaios de especiação de As devido principalmente à diferença de toxicidade entre as espécies químicas e à necessidade de melhoria nas avaliações ambientais, o desenvolvimento de métodos analíticos de especiação passou a ser fundamental para o laboratório Venturo.

Os resultados demonstraram que foi possível desenvolver um método eficiente de especiação de As em água – considerando as espécies As (III), As (V), MMA e DMA – empregando extração em fase sólida e determinação por ICP-OES. A eficiência do método está demonstrada nas faixas de recuperação apresentada, que ficaram entre 80-120% para as quatro espécies de As avaliadas. Além disso, o volume de amostra necessário para realização do método foi baixo (10 ml), o que tornou a extração rápida. Futuramente, caso necessário, o laboratório poderá testar o aumento do volume de amostra inicial para que, simultaneamente à separação das espécies, ocorra a concentração dos analitos, permitindo o atingimento de limites de quantificação mais baixos. Por isso, o método proposto é versátil.

Quatro resinas cromatográficas de troca iônica em cartuchos SPE de fabricação nacional foram avaliadas, sendo duas de troca catiônica e duas de troca aniônica. Os resultados indicaram que os cartuchos Purifica SCX e Purifica SAX apresentam seletividade e eficiência na separação das espécies de As. Além de rápido e eficiente, o emprego da extração em fase sólida é ainda mais vantajoso, visto que os cartuchos SPE utilizados são de fabricação nacional, o que reduz o custo com importação de materiais.

Também foi possível desenvolver um método eficiente de extração das espécies As (III), As (V), MMA e DMA em tecido de peixe onde o extrato final pôde ser submetido ao mesmo método de especiação

desenvolvido para água. A eficiência da extração está demonstrada pelas recuperações obtidas que ficaram entre 80% - 120%. O volume de solvente orgânico utilizado (20 ml) para extração de cada amostra foi considerado satisfatório frente a outros métodos de extração que utilizam volumes maiores de solvente. Isso diminui não apenas os custos da aquisição de reagentes, mas também a quantidade de resíduos perigosos nocivos ao meio ambiente, indo ao encontro aos preceitos da química verde.

O processo de validação metodológica demonstrou que os métodos para especificação de As em água e tecido de peixe estão aptos a serem utilizados no laboratório Venturo a partir de Auditoria do INMETRO e inclusão no escopo. O estudo da recuperação e repetitividade demonstrou que ambos os métodos atenderam aos limites estabelecidos – recuperação de 80%-120% e desvio padrão relativo  $\leq 15\%$ . Os limites de quantificação (LQ) para especificação de As em água e tecido de peixe foram considerados satisfatórios para atender às demandas de mercado atuais. O LQ para espécies de As em água poderá ser reportado em  $0,050 \text{ mg l}^{-1}$  e em tecido de peixe em  $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$ .

## 7. Referências

ABBOTT, B. W. et al. Human domination of the global water cycle absent from depictions and perceptions. **Nature geoscience**, v. 12, n. July, 2019.

ALAVA, P. et al. Extensive grinding and pressurized extraction with water are key points for effective and species preserving extraction of arsenic from rice. **Analytical Methods**, v. 4, n. 5, p. 1237–1243, 2012.

AMMANN, A. A. Arsenic speciation by gradient anion exchange narrow bore ion chromatography and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 14, p. 2111–2116, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.086>>.

AMMANN, A. A. Arsenic Speciation Analysis by Ion Chromatography - A Critical Review of Principles and Applications. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 02, n. 01, p. 27–45, 2011.

ANASTOPOULOS, I. et al. Agricultural biomass/waste as adsorbents for toxic metal decontamination of aqueous solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 295, 2019.

ANUKRATI SHUKLA; SRIVASTAVA, S. Emerging Aspects of Bioremediation of Arsenic. In: **Green Technologies and Environmental Sustainability**. [s.l: s.n.]p. 395–407.

ARDINI, F.; DAN, G.; GROTTI, M. Critical review. 2019.

ARSHAD, N. et al. Assessment of Water Quality in the Temenggor Forest Reserve Based on Physicochemical Data and Elemental Content. v. 24, n. 2, p. 1–11, 2022.

ASSIS, R. C. et al. Extraction of arsenic(III) in aqueous two-phase systems: A new methodology for determination and speciation analysis of inorganic arsenic. **Microchemical Journal**, v. 147, n. July 2018, p. 429–436, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.058>>.

BARRINGER, J. L.; REILLY, P. A. Arsenic in Groundwater : A Summary of Sources and the Biogeochemical and Hydrogeologic Factors Affecting Arsenic Occurrence and Mobility. 2002.

BOLAN, N. S. et al. **Microbial Transformation of Trace Elements in Soils in Relation to Bioavailability and Remediation**. [s.l: s.n.]v. 225

BOSCH, A. C. et al. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. n. September, 2016.

BRASIL. Resolução nº 357, 18 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial**, n. 053, p. 58–63, 2005.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017. p. 926, 2017. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>>.

BUSSAN, D.; HARRIS, A.; DOUVRIS, C. Monitoring of selected trace elements in sediments of heavily industrialized areas in Calcasieu Parish , Louisiana , United States by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy ( ICP-OES ). v. 144, n. June 2018, p. 51–55, 2019.

CARLIN, D. J. et al. Arsenic and environmental health: State of the science and future research opportunities. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 7, p. 890–899, 2016.

CHEN, B. et al. Arsenic speciation in hair and nails of acute promyelocytic leukemia (APL) patients undergoing arsenic trioxide treatment. **Talanta**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.021>>.

CHEN, K. et al. Effect of Lead Pollution Control on Environmental and Childhood Blood Lead Level in Nantong , China : An Interventional Study. 2014.

CHEN, M. L.; MA, L. Y.; CHEN, X. W. New procedures for arsenic speciation: A review. **Talanta**, v. 125, p. 78–86, 2014.

CHEN, Z. L. et al. Speciation of arsenic by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry using ammonium eluents. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 17, p. 2671–2676, 2006.

CHUNHAI YU et al. Inductively coupled plasma mass spectrometry study of the retention behavior of arsenic species on various solid phase extraction cartridges and its application in arsenic speciation. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. april 2003, p. 1335–1349, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S058485470300079X?via%3Dihub>>.

CIARDULLO, S. et al. Arsenic speciation in freshwater fish: Focus on extraction and mass balance. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 213–221, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.060>>.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Directiva 98/83/CE relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, n. 330, p. 32–54, 1998.

CONTRERAS-ACUÑA, M. et al. Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 133–141, 2013.

COSTA, M. Review of arsenic toxicity, speciation and polyadenylation of canonical histones. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 375, n. May, p. 1–4, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.05.006>>.

CUI, H. et al. Speciation of Arsenic in Rice by Ion Chromatography with Online Anion Suppression and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 50, n. 6, p. 1040–1048, 2017.

DANGLEBEN, N. L.; SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Arsenic immunotoxicity: A review. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Environmental Health>.

DAS, D.; GUPTA, U.; DAS, A. K. Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 163–171, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.020>>.

DE OLIVEIRA, R. M. et al. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 402–409, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.09.018>>.

DOS SANTOS, G. M. et al. Inorganic arsenic speciation in rice products using selective hydride generation and atomic absorption spectrometry (AAS). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 265–271, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.025>>.

DÜNDAR, M. S.; HUSEYIN, A. Determination of some major and trace elements in the lower Sakarya River water by ICP-MS. v. 2, n. December,

p. 128–139, 2018.

FLOREA, A. et al. Genotoxicity of organometallic species. In: **Organic Metal and Metalloid Species in the Environment**. [s.l: s.n.]p. 11–12.

GAO, Y. et al. Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Açú Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption. **Chemosphere**, v. 191, p. 89–96, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.031>>.

GARCÍA-SALGADO, S.; QUIJANO, M. Á. Stability of toxic arsenic species and arsenosugars found in the dry alga Hijiki and its water extracts. **Talanta**, v. 128, p. 83–91, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.038>>.

GIRI, S.; QIU, Z. Understanding the relationship of land uses and water quality in Twenty First Century : A review. v. 173, p. 41–48, 2016.

GONG, Z. et al. Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 12, p. 1409–1413, 2001.

GUEZGOUZ, N. et al. Heavy Metals Assessment in the Medjerda River Basin ( Northeastern Algeria ): A Preliminary Water Analysis and Toad Skin Biopsy. [s.d.]

GUO, M. et al. HPLC-HG-AFS determination of arsenic species in acute promyelocytic leukemia (APL) plasma and blood cells. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 356–363, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.001>>.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table. **Environments**, n. October 2014, p. 1–16, 2019. Disponível em: <[https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt\\_formats/pdf/pubs/water-eau/sum\\_guide-res\\_recom/summary-table-August-15-2019-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt_formats/pdf/pubs/water-eau/sum_guide-res_recom/summary-table-August-15-2019-eng.pdf)>.

HEDEGAARD, R. V.; SLOTH, J. J. Speciation of arsenic and mercury in feed : why and how ? v. 15, p. 45–51, 2011.

HUANG, Y. et al. Heavy metal pollution and health risk assessment of agricultural soils in a typical peri-urban area in southeast China. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 159–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.072>>.

HUGHES, M. F. et al. Arsenic Exposure and Toxicology : A Historical

Perspective. v. 123, n. 2, p. 305–332, 2011.

HUNG, D. Q.; NEKRASSOVA, O.; COMPTON, R. G. Analytical methods for inorganic arsenic in water : a review. v. 64, p. 269–277, 2004.

ISSA, N. Ben et al. Determination of inorganic arsenic species in natural waters-Benefits of separation and preconcentration on ion exchange and hybrid resins. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 2, p. 185–193, 2010.

JAIN, C. K.; ALI, I. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4304–4312, 2000.

JEONG, S. et al. Development of a simultaneous analytical method to determine arsenic speciation using HPLC-ICP-MS: Arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, dimethyldithioarsinic acid, and dimethylmonothioarsinic acid. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 295–300, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.011>>.

KIRAN MARELLA, T.; SAXENA, A.; TIWARI, A. Diatom mediated heavy metal remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 305, n. February, p. 123068, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123068>>.

KOMOROWICZ, I.; BARAŁKIEWICZ, D. Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade review. **Talanta**, v. 84, n. 2, p. 247–261, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.065>>.

KÜPPER, H. et al. Ultratrace Metal Speciation Analysis by Coupling of Sector-Field ICP-MS to High-Resolution Size Exclusion and Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 17, p. 10961–10969, 2019.

LIU, Q. et al. Speciation of arsenic - A review of phenylarsenicals and related arsenic metabolites. **Trends in Analytical Chemistry**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.006>>.

LLORENTE-MIRANDES, T.; RUBIO, R.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F. Inorganic Arsenic Determination in Food: A Review of Analytical Proposals and Quality Assessment over the Last Six Years. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 25–69, 2017.

MA, Y. et al. Human health risk assessment of heavy metals in urban stormwater. **Science of the Total Environment**, v. 557–558, p. 764–772,

2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.067>>.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019, Publica o Plano de amostragem e os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína**, Diário Oficial da União, Brasília, 25 de abril de 2019, , 2019. .

MELLO, K. De et al. Catena Effects of land use and land cover on water quality of low-order streams in Southeastern Brazil : Watershed versus riparian zone. v. 167, n. September 2017, p. 130–138, 2018.

MINISTRY OF HEALTH OF CHINA. Standards for Drinking Water Quality, National Standard of the People ' s Republic of China. p. 1–13, 2006.

NEARING, M. M.; KOCH, I.; REIMER, K. J. Complementary arsenic speciation methods : A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 99, p. 150–162, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.07.001>>.

NIEHS (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL; SCIENCES). **Health Effects and Mitigation of Arsenic : Current Research Efforts and Future Directions**, 2014. . Disponível em: <[https://www.niehs.nih.gov/news/events/pastmtg/2014/arsenic/niehs\\_arsenic\\_workshop\\_report\\_508.pdf](https://www.niehs.nih.gov/news/events/pastmtg/2014/arsenic/niehs_arsenic_workshop_report_508.pdf)>.

NOGUEIRA, R. et al. Arsenic speciation in fish and rice by HPLC-ICP-MS using salt gradient elution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1593–1600, 2018.

NORDSTROM, D. K. Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. **Science**, v. 296, n. i, p. 2143–2145, 2002.

OLASOJI, S. O. et al. Water Quality Assessment of Surface and Groundwater Sources Using a Water Quality Index Method : A Case Study of a Peri-Urban Town in Southwest , Nigeria. n. I, [s.d.]

PARK, M. K. et al. An improved rapid analytical method for the arsenic speciation analysis of marine environmental samples using high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 8, 2019.

PEREIRA, É. R. et al. Arsenic containing medium and long chain fatty

acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 9, p. 1836–1845, 2016.

PÉTURSDÓTTIR, Á. H. et al. Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter? **Food Chemistry**, v. 150, p. 353–359, 2014.

PIZARRO, I. et al. Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, n. 1–2, p. 85–98, 2003.

PLANER-FRIEDRICH, B. et al. Thioarsenate Toxicity and Tolerance in the Model System *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 7187–7196, 2017.

POZEBON, D. et al. Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column. **Talanta**, v. 45, n. 6, p. 1167–1175, 1998.

RAJAKOVIĆ, L. V. et al. Analytical methods for arsenic speciation analysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 10, p. 1461–1479, 2013.

REID, M. S. et al. Journal Pre-proof. 2019a.

REID, M. S. et al. Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 115770, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115770>>.

RENGEL, Z. Heavy Metals as Essential Nutrients. **Heavy Metal Stress in Plants**, p. 271–294, 2004.

SAHA, N. et al. Industrial metal pollution in water and probabilistic assessment of human health risk. **Journal of Environmental Management**, v. 185, p. 70–78, 2017.

SANA KHALID et al. **Arsenic Behaviour in Soil-Plant System: Biogeochemical Reactions and Chemical Speciation Influence**. [s.l: s.n.]v. 2

SCHMIDT, L. et al. Arsenic Speciation in Seafood by LC-ICP-MS/MS: Method Development and Influence of Culinary Treatment. 2017.

SON, S. H. et al. An alternative analytical method for determining arsenic

species in rice by using ion chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 270, n. June 2018, p. 353–358, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.066>>.

SUGÁR, É. et al. Field separation-based speciation analysis of inorganic arsenic in public well water in Hungary. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 131–135, 2013.

TCHOUNWOU, P. B. et al. **Heavy Metal Toxicity and the Environment**. [s.l: s.n.]v. 101

TCHOUNWOU, P. B. et al. State of the science review of the health effects of inorganic arsenic : Perspectives for future research. n. October 2018, p. 188–202, 2019.

URBAN, R. C.; ROMERO, J. R.; CAMPOS, M. L. A. M. Development of a portable sensor to evaluate copper speciation in natural waters.

**Analytical Methods**, v. 10, n. 17, p. 2056–2063, 2018. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1039/C8AY00414E>>.

USEPA. 2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables. n. March, 2018.

WHO, (World Health Organization). A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. **IARC Monographs**, v. 100 C, p. 1-527, 2012.

WHO, (World Health Organization). Guidelines for Drinking water Quality. 4. ed. 2017.

WU, Y. et al. Environmental remediation of heavy metal ions by novel-nanomaterials: A review. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 608–620, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.076>>.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils : A Review of Sources , Chemistry , Risks and Best Available Strategies for Remediation. v. 2011, 2011.

ZHANG, X. et al. Impact of Soil Heavy Metal Pollution on Food Safety in China. p. 1–14, 2015.

ZHAO, F. et al. Enzyme-assisted extraction and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic species in fish. **Journal of Chromatography A**, v. 1573, p. 48–58, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.068>>.

ZHENG, J.; HINTELMANN, H. Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 191–195, 2004.