UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Avaliação dos teores de arsênio total em cação, por meio de
técnicas espectrométricas

Marise Cristina Soares de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora :
Profa .Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo
2005

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Avaliação dos teores de arsênio total em cação, por meio de
técnicas espectrométricas

Marise Cristina Soares de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora :
Profa .Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo

2005

JB145

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010565

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A477a Almeida, Marise Cristina Soares de
Avaliação dos teores de arsênio total em cação, por meio
de técnicas espectrométricas / Marise Cristina Soares de
Almeida. -- São Paulo, 2005.
85p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Contaminação de alimento : Toxicologia 2. Arsênio
3. Espectrometria : Análise : Toxicologia I. T. II. Nascimento,
Elizabeth de Souza, orientador.

615.954. CDD

Marise Cristina Soares de Almeida

Avaliação dos teores de arsênio total em cação, por meio de
técnicas espectrométricas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
orientador/presidente

Dra. Alice Momoyo Ata Sakuma
1º Examinador

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho
2º Examinador

São Paulo, 13 de Abril de 2005.

“Todas as coisas concorrem,
para o bem dos que amam a Deus”

Rm 8,28

Dedico este trabalho

À minha família, meus pais Maria e Luiz Carlos,
meus irmãos Márcia e Luiz Gustavo e a todos
os familiares e amigos, em especial
Betty Sachs, que me ajudaram de
diversas formas. Que Deus abençoe à todos.

Dedico este trabalho

À Prof. Elizabeth de Souza Nascimento, e agradeço
por todo apoio, carinho, estímulo e principalmente
por ter confiado e acreditado em mim, que Deus a abençoe.

AGRADECIMENTOS

Aos Coordenadores do curso de Pós-graduação em Farmácia, Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo;

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES- pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, como também aos professores da Faculdade de Saúde Pública, pelos ensinamentos durante a realização do curso.

Aos professores Dra. Alice Momoyo Sakuma, e Prof. Dr. Alfredo Tenuta, pelas importantes sugestões e correções feitas no exame de qualificação;

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelo carinho, companheirismo, e atenção com que me receberam, e me ajudaram;

À funcionária Ivanir Pires, do Laboratório de Bioquímica da Nutrição, pelas orientações e uso do equipamento espectrofômetro;

À prof. Célia Colli, por sua simpatia, atenção e orientação com a estatística apresentada neste trabalho;

Meu especial agradecimento ao pessoal do laboratório de análise de contaminantes, setor de equipamentos especializados do Instituto Adolfo Lutz;

Meu especial agradecimento ao pessoal da Biblioteca do Conjunto das Químicas, Leila e Adriana pelas orientações quanto a bibliografia;

À todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram e orientaram com carinho e atenção durante o período em que foi feito este trabalho.

SUMÁRIO

PÁGINA

1.INTRODUÇÃO.....	01
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Propriedades físicas e químicas do arsênio.....	04
2.2 Usos e fontes de exposição.....	05
2.3 Toxicocinética.....	06
2.4 Mecanismos de ação tóxica.....	10
2.5 Síndrome tóxica.....	10
2.6 Relação dose - efeito.....	11
2.7 Parâmetros dos órgãos regulamentadores.....	12
2.8 Metodologia analítica.....	13
2.8.1 Técnicas analíticas para determinação de arsênio total em alimentos..	14
2.8.1.1 Espectrometria no ultra violeta e visível.....	17
2.8.1.2 Espectrometria por absorção atômica com geração de hidretos.....	18
2.9 Digestão de amostras.....	19
3. OBJETIVO.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Material.....	27
4.1.1 Amostras.....	27
4.1.2 Vidrarias.....	27
4.1.3 Reagentes.....	28
4.1.4 Material de referência certificado (MRC).....	28
4.1.5 Solução padrão.....	29
4.1.6 Soluções.....	29
4.1.7 Equipamentos e acessórios.....	30
4.2 Métodos para determinação de arsênio total.....	30

4.2.1 Mineralização das amostras por via seca.....	30
4.2.1.1 Técnica da espectrofotometria na região do visível com dietilditiocarbamato de prata.....	31
4.2.1.2 Preparo da curva padrão.....	32
4.2.2 Método por espectrometria por absorção atômica com geração de hidretos.....	34
4.2.2.1 Mineralização das amostras por via seca.....	34
4.2.2.1.1 Redução com L- cisteína.....	34
4.2.2.1.2 Redução com uréia.....	34
4.2.2.1.3 Redução com iodeto de potássio e ácido ascórbico.....	35
4.2.3 Preparo da curva padrão.....	35
4.2.3.1 Redução com L – cisteína.....	35
4.2.3.2 Redução com uréia.....	36
4.2.3.3 Redução com iodeto de potássio e ácido ascórbico.....	36
4.2.4. Determinação espectrométrica no absorção atômica com gerador de hidretos.....	38
4.2.5 Material de Referência Certificado (MRC).....	38
4.3 Parâmetros de validação.....	39
4.3.1 Recuperação.....	39
4.3.2. Linearidade.....	40
4.3.3 Limite de detecção.....	40
4.3.4 Limite de quantificação.....	41
4.3.5 Exatidão do método analítico.....	42
4.4 Avaliação da interferência do cozimento das amostras por forno de microondas, previamente à mineralização.....	42
4.5 Avaliação da interferência da concentração do magnésio usado na mineralização das amostras, para determinação do As total por HGAAS.....	43
4.6 Amostras avaliadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	43
4.7 Determinação do teor de As nas amostras de cação por absorção atômica.....	43

4.8 Análises estatísticas.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Padronização do método do dietilditiocarbamato de prata.....	44
5.1.1 Recuperação.....	44
5.1.2 Linearidade.....	44
5.1.3 Limite de detecção.....	46
5.1.4 Limite de quantificação.....	46
5.1.5 Determinação dos teores de As em cação.....	46
5.2 Resultados obtidos na análise com o método espectrométrico por absorção atômica com gerador de hidretos.....	48
5.2.1 Resultados referentes as amostras certificadas analisadas pelo método da L- cisteína.....	48
5.2.2 Resultados referentes as amostras certificadas analisadas pelo método da uréia.....	48
5.2.3 Resultados referentes as amostras certificadas analisadas pelo método do iodeto de potássio e ácido ascórbico.....	49
5.2.4 Resultados das curvas de calibração dos métodos da L- cisteína, uréia e iodeto de potásio e ácido ascórbico.....	50
5.2.5 Validação do método analítico.....	51
5.2.6 Limite de detecção.....	51
5.2.7 Limite de quantificação.....	51
5.2.8 Exatidão do método.....	51
5.2.9 Interferência do cozimento das amostras em forno de microondas, previamente a mineralização.....	52
5.2.10 Estudo da interferência do magnésio usado na mineralização para determinação de As total.....	53
5.2.11 Teores de As total em amostras de cação analisados pelos métodos do dietilditiocarbamato de Ag e por HGAAS.....	54
5.3 Análises estatísticas.....	55

5.3.1 Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	55
5.3.2 Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total, em amostra de cação cru e cozido em microondas pelo método do HGAAS.....	56
5.3.3. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total, em amostra de cação analisadas por ambos os métodos DDC-Ag e HGAAS.....	57
5.3.4. Representação gráfica da dispersão dos teores de As total, em amostras de cação analisadas por ambos os métodos HGAAS e DDC-Ag.....	58
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	69
8. RECOMENDAÇÕES.....	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Limites máximos de tolerância de arsênio em diversos alimentos...	13
Tabela 2	Condições analíticas utilizadas na determinação de arsênio em algumas matrizes.....	22
Tabela 3	Condições de operação do FIAS – HGAAS.....	38
Tabela 4	Recuperação do arsênio em cação pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	44
Tabela 5	Teores de As total em amostras de cação, analisadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	47
Tabela 6	Resultado das amostras de material de referência certificado usando L-Cisteína na pré-redução, e leitura pela técnica, por HGAAS.....	48
Tabela 7	Resultados das amostras de material de referência certificados analisadas pelo método de pré-redução com Uréia, por HGAAS.....	49
Tabela 8	Resultados das amostras de material de referência certificados analisadas pelo método de pré-redução com Iodeto de Potássio e ácido ascórbico, e determinação por HGAAS.....	49
Tabela 9	Resultados das amostras certificados, utilizadas na determinação da exatidão pelo método da uréia, por HGAAS.....	52
Tabela 10	Resultados dos teores de As total , por HGAAS, em amostra de cação (10 replicatas) analisada sem e com prévio cozimento em microondas.....	53

Tabela 11 Teores de As em mg/Kg nas amostras analisadas pelos métodos do dietilditiocarbamato de prata (DDC-Ag) e por absorção atômica com gerador de hidretos e respectivos desvios padrão e C.V.....	55
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aparelhagem para geração de arsina.....	18
Figura 2	. Esquema do sistema de injeção em fluxo para geração de hidretos.....	19
Figura 3	Fluxograma da análise de arsênio pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	33
Figura 4	Marcha analítica da determinação de arsênio por absorção atômica com gerador de hidretos.....	37
Figura 5	Representação gráfica da curva de calibração de As pelo método do dietilditiocarbamato de prata (5 a 20µg/5mL).....	45
Figura 6	Representação gráfica da curva de calibração de As pelo método do dietilditiocarbamato de prata (0,25 a 10,0 µg / 5mL).....	45
Figura 7	Curva de calibração de arsênio total, usando L-Cisteína na pré-redução.....	50
Figura 8	Curva de calibração de arsênio total, usando Uréia na pré-redução.....	50
Figura 9	Curva de calibração de arsênio total, usando KI e Ácido ascórbico na pré-redução.....	51
Figura 10	Interferência do magnésio, usado na mineralização, na determinação de As total por HGAAS.....	54
Figura 11	Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total nas amostras de cação analisadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata.....	56
Figura 12	Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total na amostra de cação cru e cozido em microondas.....	57
Figura 13	Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total em cação pelos métodos DDC-Ag e HGAAS.....	58

Figura 14 Gráfico da dispersão dos resultados das amostras analisadas pelos métodos de HGAAS e DDC-Ag.....	58
--	----

SIGLAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica

AFS - Espectrometria de fluorescência atômica

DDC-Ag - Dietilditiocarbamato de prata

ETAAS - Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

FAAS - Espectrometria de absorção atômica por chama

FAFS - Espectrometria de fluorescência atômica por chama

FI-HG AAS - Espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos e injeção em fluxo.

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica no forno de grafite.

HG AAS - Espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos.

HPLC-ICP MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente.

HPLC-MW-HG AAS - Digestão em microondas com espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência.

IAL - Instituto Adolfo Lutz.

IC-ICP MS - Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado com cromatografia iônica.

ICP MS - Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado.

ICP OES - Espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado.

MRC's – Materiais de Referência Certificados.

NaBH₄ - Borohidreto de sódio.

SDDC-Ag - Espectrofotometria no visível com dietilditiocarbamato de prata.

RESUMO

O arsênio é um importante contaminante estudado em toxicologia, pois pode estar presente em alimentos e no meio ambiente. Seus efeitos nocivos para humanos depende da forma química, onde os arsenicais trivalentes apresentam maior toxicidade e as formas inorgânicas são melhor absorvidas pelo organismo. Seus efeitos tóxicos podem envolver os sistemas respiratórios, gastrointestinal, cardiovascular, nervoso e hematopoiético. O arsênio pode ser encontrado em alguns gêneros alimentícios em concentrações menores que 1 mg/Kg. Em frutos do mar, tais como peixes pode conter teores que vão desde 1 a mais de 100 mg/Kg e em outros alimentos à base de peixe podem chegar à algumas miligramas por quilo, predominantemente na forma orgânica. A quantidade de arsênio ingerido pelo homem está diretamente influenciada pelo consumo de alimentos marinhos incluídos na dieta. Este trabalho tem por objetivo comparar duas técnicas: a colorimétrica, com o método do dietilditiocarbamato de prata e por absorção atômica com gerador de hidretos (HGAAS) e com isso avaliar a presença de arsênio em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo. O método colorimétrico do dietilditiocarbamato de prata, baseia-se na transformação das diversas formas orgânica ou inorgânica de arsênio presentes nos alimentos, em pentóxido de arsênio e sua redução final à arsina, através do meio ácido e da presença de hidrogênio nascente liberado na reação do ácido com zinco metálico. No segundo método as amostras são mineralizadas e quantificadas no Absorção Atômica com gerador de hidretos(HGAAS).O método do dietilditiocarbamato de prata apresentou limite de detecção e quantificação de 0,05 e 0,1 µg/mL, respectivamente. A linearidade obtida com massas de 5 a 20 µg apresentou um coeficiente de determinação de 0,9970. Por este método foram analisadas 18 amostras de cação com níveis entre 0,17 à 3,79 mg/Kg. Com a técnica por HGAAS foi analisado MRC de ostra e foi obtido recuperação em torno de 94%. Foi encontrado limite de detecção de 0,93 µg/L e limite de quantificação de 1,49 µg/L. Foram analisadas 9 amostras por ambas as técnicas e 89% delas continham teores de arsênio total acima de 1 mg/Kg, que é o limite admitido pela legislação brasileira.

ABSTRACT

Arsenic is an important pollutant studied in toxicology, due to the fact that it can be present in food and in the environment. Its toxicity for humans depends on its chemical structure where trivalent arsenicals show higher toxicity and inorganic forms are better absorbed by the organism. Its toxicant effects can involve the respiratory, gastrointestinal, cardiovascular, nervous and blood systems. The arsenic can be found in some foods in smaller concentrations than 1 mg/Kg. Fish and crustaceans may contain 1 to 100 mg/Kg, in some cases, marine fishes may show amounts of As up to milligrams per kilogram, predominantly in the organic form. The amount of arsenic ingested by man is directly influenced by the consumption of marine food included in the diet. This present work compares two techniques: the colorimetric, with the method of the silver diethyldithiocarbamate and the atomic absorption with hydride generator (HGAAS) aiming the evaluation of total arsenic present in samples of fish marketed in the city of São Paulo. The method using silver diethyldithiocarbamate, is based on the transformation of all organic or inorganic forms of arsenic present in edible parts of fish, in arsenic pentoxide and its final reduction to arsine. In the second method the samples are mineralized and quantified by atomic absorption with hydride generator. The first method showed limit of detection and quantification of 0,05 and 0,1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Linearity obtained with masses of 5 to 20 μg showed a coefficient of determination of 0,9970. By this method 18 fish samples were analyzed showing levels of 0,17 to 3,79 mg/Kg. By HGAAS method oyster certified reference material was analyzed and it was obtained a recovery of 94%, limit of detection of 0,93 $\mu\text{g/L}$ and limit of quantification of 1,49 $\mu\text{g/L}$. Nine samples were analyzed by both techniques and 89% of them have As content higher than 1 mg/Kg, which is the limit admitted by the Brazilian legislation.

1. INTRODUÇÃO

Os metais são constituintes normais da crosta terrestre e dos oceanos. Sua ocorrência, na forma de traços, também é constatada em todas as plantas e animais e, conseqüentemente, podem, através da cadeia alimentar, atingir o homem (ZANINI e OGA, 1996). É o caso do arsênio, um metalóide, pertencente ao grupo VA da tabela periódica, é considerado um dos mais importantes do ponto de vista toxicológico. Este semi-metal ocorre naturalmente no ambiente e pode ser encontrado nos alimentos (LEBLANC e JACKSON, 1973), oriundo da atividade antropogênica, como a mineração e utilização industrial ou do tratamento agrícola por meio dos praguicidas arseniais. O arsênio elementar ou metálico é utilizado como agente de fusão para metais pesados em processos de soldagens e na produção de cristais de silício e germânio. É também adicionado à outros metais, como na fabricação de placas de chumbo de baterias elétricas e ao chumbo na fabricação de munições. Os efeitos tóxicos podem envolver os sistemas respiratório, gastro-intestinal, cardiovascular, nervoso e hematopoiético (JAIN e ALI, 2000; MANTOVANI e ANGELUCCI, 1992; MELO *et al.*, 1999).

A presença de arsênio em águas naturais está geralmente associada com o ambiente geoquímico através dos depósitos vulcânicos, bacias fluviais-lacustres e minerações. No ecossistema aquático a acumulação é alta principalmente em organismos marinhos, como os peixes, que podem conter concentrações de arsênio na ordem de 5 mg/Kg, predominantemente na forma orgânica (HERSHEY *et al.*, 1988; JAIN e ALI, 2000; LEBLANC e JACKSON, 1973; WHO, 1981).

Vários compostos arseniais foram usados na medicina, como o arsênio inorgânico trivalente na forma de arsenito de sódio (Solução de Fowler's), bem como dependente da dose também foi usado no tratamento de leucemia, psoríose e como tônico. A homeopatia utiliza dois compostos arseniais: o primeiro deles é o óxido branco de arsênio (Arsenicum Album) considerado como atuante em todo o organismo, e apresentando seletividade ao sistema nervoso autônomo e simpático; o segundo é o

triodeto de arsênio tido como atuante em casos de fraqueza muscular (astenia), aterosclerose e cardiopatias (WHO, 1981; ZANINI *et al.*, 1997).

Os efeitos tóxicos dos compostos arseniais são relatados na literatura, e a contaminação ambiental e dos alimentos é um problema mundial, resultando num interesse sempre crescente na quantificação desse composto em alimentos, bem como na implementação de métodos rápidos, sensíveis e reprodutíveis capazes de detectar baixas concentrações de compostos arseniais nas mais variadas amostras (JAIN e ALI, 2000).

Duas são as técnicas mais utilizadas na determinação do arsênio em diversos substratos que vão desde o espectrofotométrico utilizando o dietilditiocarbamato de prata e o espectrométrico de absorção atômica com gerador de hidretos.

O primeiro método se baseia na transformação, das diversas formas orgânica ou inorgânica de arsênio presentes nos alimentos, em arsênio trivalente e em seguida sua redução à arsina, em meio ácido na presença de hidrogênio nascente liberado na reação do ácido com zinco metálico. A arsina formada é absorvida em solução de dietilditiocarbamato de prata em piridina, com formação de um complexo colorido avermelhado cuja intensidade pode ser estimada em espectrofotômetro a 540 nm. É um método de baixo custo, que não exige equipamento sofisticado (GEORGE *et al.*, 1973, MANTOVANI e ANGELUCCI, 1992).

A quantificação pela técnica da espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos, consiste na prévia conversão do arsênio presente na amostra na forma de arsênio trivalente, seguida da formação de arsina, como foi mencionado no primeiro método, e a conversão para arsênio elementar, a uma temperatura de 900°C (MELO *et al.*, 1999; WHO, 1981; HERSHEY *et al.*, 1988; A.O.A.C., 1990).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento dos métodos, o do dietilditiocarbamato de prata, método espectrofotométrico e o de espectrometria de absorção atômica (HGAAS), e determinar os teores de arsênio em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo. Os métodos serão comparados quanto à sensibilidade, recuperação e exatidão, relacionando o custo e o benefício de ambos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Propriedades físicas e químicas do arsênio

O arsênio (As) é um elemento metalóide, de ocorrência natural, pertencendo ao grupo cinco A (VA) da tabela periódica, e vem sendo estudado desde 3000 anos A.C. Apresenta cor cinza-prateada de forma sólida cristalina (α -arsênico), e seus compostos ocorrem nas formas de estruturas romboédricas ou amorfas, cristalinas e na forma de pó. Exposto ao ar, perde o brilho e produz um sólido amorfo de cor preta (β -arsênico) e trióxido de arsênio (As_2O_3). Apresenta peso atômico de 74,92, densidade de 5,727 g/cm³, ponto de fusão 817 °C à 28 atm (ZANINI e OGA, 1996, WHO, 1981).

O As encontra-se amplamente distribuído na natureza num grande número de minerais, acompanhando o enxofre, oxigênio e ferro. Pode formar diversos compostos químicos dependendo de seu estado de oxidação (-3; 0; +3 e +5). Os compostos arseniais formam óxidos ácidos ou anidridos como o $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$ e o $\text{Ca}_3(\text{AsO}_3)_2$, respectivamente, arsenato e arsenito de cálcio que são compostos hidrossolúveis. Pode também ser encontrado como arseniato de cobre, chumbo, prata e ouro ou ainda como sulfetos. O Na_3AsO_4 e o NaAsO_2 , respectivamente, arsenato e arsenito de sódio são compostos muito solúveis e os mais comumente encontrados na água. O As_2O_3 , trióxido de arsênico e o H_3AsO_4 , ácido arsênico são hidrossolúveis na proporção de 2,1 e 302 g/ 100 mL, respectivamente. O As_2S_3 trissulfeto de arsênio é insolúvel na água.

A arsina (AsH_3) é um gás incolor, que apresenta um odor de alho, é solúvel na água e levemente solúvel em álcool e alcális, com densidade de 2,695, ponto de fusão de 116,3 °C, ponto de ebulição 55°C, ponto de decomposição de 300 °C e pressão de vapor superior à 1 atm.

As formas metiladas de arsênio são compostos que ocorrem naturalmente no ambiente como resultado de atividades biológicas (CARABANTES, 2003; WHO, 1981; ZANINI e OGA, 1996; JAIN e ALI, 2000). Os organismos aquáticos tendem a acumular metais pesados e contaminantes orgânicos em seus tecidos, mesmo quando a água em que habitam apresenta níveis desses compostos abaixo da concentração máxima tolerada pela legislação, propiciando grandes riscos de contaminação dentro da cadeia trófica. No caso dos peixes, a ingestão de alimentos e água é a via principal de entrada de contaminantes nesses organismos (CAMPOS *et al.*, 2002; CARABANTES, 2003).

2.2 Usos e fontes de exposição

O arsênico metálico ou elementar é utilizado como agente de fusão para metais pesados, em processos de soldagens e na produção de cristais de silício e germânio. É adicionado a outros metais, em processos industriais, como na produção de placas de chumbo, de baterias elétricas, e ao chumbo na fabricação de munições e ligas. Os arsenitos (AsO_3^{3-}) são usados como herbicidas; os arsenatos (AsO_4^{3-}), na forma de arsenato de cálcio, são usados como inseticidas e os sulfetos de arsênio são usados na produção de pigmentos (WHO, 1981).

O arseniato de gálio (GaAs) é utilizado na fabricação de semicondutores; o tricloreto de arsênio (AsCl_3) é empregado em sínteses químicas; o trióxido de arsênio (As_2O_3) é obtido durante os processos de fundição de minérios de cobre, chumbo e zinco e a arsina (AsH_3) apresenta maior risco quando é sub-produto formado pela reação de um metal (impureza do arsênio) com um ácido, e mais raramente com uma base forte (WHO, 1981; WHO, 2001; ZANINI e OGA, 1996).

As concentrações de arsênio no ar ambiente em áreas urbanas podem variar desde nanogramas a microgramas por metro cúbico. Também

pode ser tolerado em alguns gêneros alimentícios em concentrações inferiores a 1 mg/Kg. Vinhos e águas minerais também podem conter alguns microgramas de arsênio por litro, provavelmente como resultado do uso de praguicidas arseniais. As formas inorgânicas de arsênio têm sido apresentadas como predominante no vinho (WHO, 1981; WHO, 2001).

Segundo ACKLEY *et al.*, 1999 a determinação do arsênio total não é suficiente para avaliar os riscos associados com o consumo do arsênio presente em gêneros alimentícios, e a toxicidade é dependente da forma química, a do arsênio inorgânico como arsenito e arsenato são mais tóxicos que o ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). A arsenobetaina e arsenocolina são relativamente atóxicas. Dessa forma, atualmente tem sido dada maior atenção para a especiação elementar do arsênio em amostras ambientais e biológicas.

A arsenobetaina tem sido identificada como a maior variedade arsenial nos frutos do mar incluindo vários produtos à base de peixe. A arsenobetaina embora seja o metabólito final do arsênio na cadeia alimentar marinha, não está presente em todas as espécies de peixe, e a transformação sofrida pelo arsênio na cadeia alimentar marinha ainda é objeto de estudos.

2.3 Toxicocinética

A exposição humana ao arsênio pode ocorrer por diferentes vias de exposição (oral, respiratória e dérmica), sendo a via oral a principal causa de exposição não ocupacional, devido a ingestão de alimentos e bebidas contendo compostos arseniais (WHO, 2001).

As exposições ao arsênio no ambiente de trabalho, normalmente ocorrem à partir de compostos inorgânicos como partículas depositadas nas vias aéreas. Além de serem parcialmente absorvidas através da via respiratória, são introduzidas pelo trato gastrointestinal após depuração

mucociliar. Absorvido, o arsênio distribui-se na fração eritrocitária, cerca de três vezes mais do que na plasmática; é sabido que o mesmo não se liga firmemente às proteínas séricas. É eliminado através dos rins, na forma inalterada, ou após biotransformação. Os seus derivados MMA (Ácido monometilarsônico) e DMA (Ácido dimetilarsínico) são menos tóxicos que os arseniais inorgânicos, sendo que este processo de metilação representa um verdadeiro mecanismo de desintoxicação. Nas primeiras horas após o início da exposição, a excreção de arsênio na urina é representada principalmente pela forma inorgânica, e após cerca de 8 horas as espécies metiladas são as preponderantes. O arsênio na forma inorgânica é eliminado parcialmente pela bile. Em razão dos elevados teores de queratina, rica em grupos sulfidrilas, o cabelo e as unhas refletem os níveis de exposição, principalmente do arsênio inorgânico (GOYER,1996; WHO,1981; ZANINI e OGA,1996)

A meia vida do arsênio inorgânico é de duas horas no sangue humano, assim, a sua presença neste fluido biológico indica uma exposição recente. Admite-se que a cinética de eliminação do arsênio no plasma e sangue humanos é similar. Entretanto os níveis de arsênio nos eritrócitos geralmente aumentam rapidamente chegando a ser mais elevados que no plasma em poucas horas de exposição e os resultados são similares aos encontrados em animais (WHO, 2001).

No organismo humano ocorre uma ampla distribuição do As, nos casos de exposição crônica em baixas concentrações e em casos de intoxicação. As concentrações mais elevadas de arsênio inorgânico ocorrem nos rins, pulmão e baço, fato este evidenciado em tecidos de vítimas de um acidente em Bombay, na Índia (WHO 2001).

Em amostras de tecido humano, obtidas de japoneses que morreram de câncer ou hemorragia cerebral, as maiores concentrações de arsênio correspondem ao arsênio inorgânico, seguido pelo DMA. O MMA foi

encontrado em níveis mais baixos, detectados somente no fígado e rins (CARABANTES, 2003, WHO 2001).

O As pode ser detectado na pele, em casos de exposição crônica em baixos níveis, pois apresenta grande afinidade pelos grupos sulfidrilas das proteínas, particularmente a queratina. Os depósitos na pele são maiores nas camadas granulosas e basais da epiderme. Este composto está distribuído principalmente na porção lípida em tecido cerebral de humanos. A matéria branca do cérebro contém 2,7 vezes mais arsênio que a matéria cinza do córtex cerebral. As maiores concentrações de arsênio em tecidos humanos correspondem a arsênio inorgânico, seguido do DMA, e o MMA pode ser encontrado em baixos níveis no fígado e rins (WHO, 2001).

Em relação a biotransformação HOPENHAYN-RICH *et al.*, 1996 estudou os padrões de metilação de um grupo de indivíduos cronicamente expostos a altos níveis de arsênio na água de consumo (600 µg/L) aos quais durante dois meses beberam água com um nível baixo de arsênio (45 µg/L). Os autores observaram uma grande variação nos padrões de metilação do arsênio, que poderia ser explicada pelo polimorfismo genético das enzimas encarregadas da metilação do arsênio inorgânico. Nos dois meses de estudo foi observada pequena diminuição na percentagem do arsênio inorgânico excretado na urina, bem como na percentagem do MMA. A razão MMA/DMA diminuiu como consequência de um pequeno aumento na percentagem do DMA eliminado. Não ficou demonstrado um limite na capacidade de metilação já que a diferença nas porcentagens de arsênio inorgânico e seus produtos de biotransformação foram insignificantes. É possível que parte do arsênio ingerido tenda a acumular no organismo, provavelmente unido a proteínas, para posterior metilação. As diferenças encontradas na razão MMA/DMA aconteceram para variáveis como hábito de fumar e sexo masculino. A menor diferença na razão MMA/DMA foi para variáveis como tempo de residência, etnia e sexo feminino. (WHO, 2001; CARABANTES, 2003).

A ingestão de compostos arseniais orgânicos ocorre pelo consumo de alimentos marinhos, como peixes e crustáceos. A principal forma arsenial orgânica identificada corresponde a arsenobetaína ($\text{Me}_3 \text{As}^+ \text{CH}_2\text{COO}^-$) e foi encontrada em tubarão, lagosta e outras espécies. A arsenobetaína é a principal espécie arsenial orgânica encontrada em crustáceos, em algas comestíveis, ostras e em outros bivalvos são encontrados principalmente arsenoaçúcares. Os arsenoaçúcares, difere da arsenobetaína pois sofrem transformação no organismo humano e incrementam as concentrações do DMA na urina (WHO, 2001; CARABANTES,2003).

A grande variação interindividual na metilação do arsênio é também uma característica do metabolismo do arsênio. Fatores como dose, idade, sexo, hábito de fumar contam como parte dessa variação. Admite-se que grande parte da variação observada poderia ser explicada por diferenças genéticas na atividade das enzimas metiladoras e dos co-fatores relacionados. Há algumas indicações que a metilação do arsênio poderia ser inibida por uma exposição aguda alta (WHO, 2001).

O arsênio proveniente de alimentos de origem marinha parece ser excretado rapidamente. Os compostos organoarseniais (MMA, DMA, arsenobetaína, arsenoaçúcares) são menos biotransformados e mais facilmente eliminados na urina, quando comparados com arsênio inorgânico em animais e humanos. Observam-se diferenças individuais na excreção de produtos de biotransformação de arsênio, principalmente na urina. Outras vias podem permitir a sua eliminação, além da fecal e urinária. Pode também ocorrer a eliminação pelo suor, pois indivíduos intoxicados por arsênio exalam forte odor de alho, ocasionado pelo ácido trimetilarsínico, que produz este odor característico.

2.4 Mecanismos de ação tóxica

Os mecanismos de ação tóxica do arsênio envolvem o arsênio trivalente e o arsênio pentavalente. O arsênio trivalente é mais tóxico que a forma pentavalente. O arsênio trivalente interage com proteínas que apresentam grupos tióis em sua estrutura química. Esses grupos tióis podem estar presentes em enzimas, portanto o arsenito pode afetar a atividade das enzimas na glucólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou glicogênese. Algumas enzimas-alvos dos compostos arsenicais são: alfa-cetoglutarato desidrogenase, β -hidroxibutirato desidrogenase, malato desidrogenase, o complexo enzimático da piruvato desidrogenase, citocromo oxidase e ureasa (WHO, 2001).

O arsênio inorgânico trivalente (As^{3+}) reage com grupos sulfidrilas de moléculas orgânicas, especialmente as proteínas. Várias enzimas que contém grupos sulfidrilas são afetadas pelo arsênio, provocando a supressão de substratos dependentes de NAD, como o piruvato, glutamato de α - cetoglutarato, interferindo portanto, na respiração celular, na mitocôndria. A ação ocorre por inibição do ácido lipóico, na sua forma reduzida, responsável pela oxidação dos substratos. O arsênio trivalente diminui a fosforilação oxidativa mitocondrial e esse fenômeno está associado à estimulação da atividade da ATPase. É possível que o As^{5+} seja reduzido ao As^{3+} na mitocôndria, e daí teria condições de exercer ação tóxica, como inibir a respiração celular e diminuir a fosforilação oxidativa, conforme estudos "in vitro" e "in vivo" revelam (GOYER, 1996; WHO, 1981; ZANINI e OGA, 1996).

2.5 Síndrome tóxica

Nas exposições intensas, os efeitos sub-agudos, envolvem principalmente os sistemas respiratórios, cardiovascular, nervoso e hematopoiético. São observados, no sistema respiratório, irritação nas

mucosas nasais, laringe e brônquios, insuficiência pulmonar, traqueobronquite, tosse crônica e fibrose intersticial difusa. No sistema cardiovascular podem ocorrer alterações detectáveis no eletrocardiograma, lesões vasculares periféricas, gangrena (doença dos pés pretos). No sistema nervoso podem ocorrer alterações sensoriais e polineuropatias. No sistema hematopoiético podem ser observadas leucopenia e granulocitopenia. A arsina pode causar hemólise intravascular e anemia, bem como danos renais. Há evidência da ação carcinogênica em humanos, principalmente câncer de pele e dos brônquios (GOYER, 1996; ZANINI e OGA, 1996)

A principal exposição ao arsênio por via oral é pela água, alimentos e medicamentos contendo arsênio. O consumo de água contendo arsênio foi relacionado com doenças de pele, incluindo câncer, e cânceres em outros órgãos internos.

De acordo com UTHUS, 1994, nos Estados Unidos a média estimada para a ingestão diária de arsênio por alimentos é de 12 a 40 µg. Os alimentos marinhos, grãos e cereais contribuem com a maior parte do arsênio na dieta. O arsênio dos alimentos é principalmente orgânico, considerado menos tóxico que as formas inorgânicas. De acordo com a FAO/WHO a dose diária máxima aceitável de arsênio é de 2 µg/kg. O arsênio orgânico dos alimentos marinhos é altamente absorvido, cerca de 80%. Assim, a maior parte do arsênio ingerido é na forma de composto orgânico, pelo consumo de frutos do mar e pescado. As formas inorgânicas de arsênio são consideradas mais tóxicas e são encontradas principalmente na água para consumo humano. (CARABANTES, 2003, UTHUS, 1994)

2.6 Relação dose - efeito

A DL 50 para compostos inorgânicos de arsênio varia entre 10 a 300 mg/Kg. Os compostos hidrossolúveis são mais tóxicos que os menos solúveis. A DL 50 para o trióxido de arsênio (As₂O₃) varia de 26 à 47 mg/Kg

em camundongos, e 15 mg/Kg em ratos. A arsina (AsH_3) é extremamente tóxica na concentração de 250 ppm durante uma exposição de 30 minutos, pode ser letal, e pode provocar intoxicações numa concentração de 3-10 ppm/h. Níveis urinários na concentração de 0,8 mg/L podem levar a intoxicações que poderiam ocasionar dermatites, perfurações do septo nasal, faringite e conjuntivite, e níveis acima de 2 mg/L podem ocasionar anemia severa. (GOYER, 1996; ZANINI e OGA, 1996)

2.7 Parâmetros dos órgãos regulamentadores

A Legislação Brasileira regulamenta os níveis de arsênio em alguns alimentos e gêneros alimentícios, conforme a Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, a qual aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos", segundo a publicação no D.O.U. - Diário Oficial da União do Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998, o órgão emissor desta é o Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS), a área de atuação é Alimentos. Na Tabela 1 estão dispostos os limites máximos de tolerância para o arsênio em diversos alimentos:

Outras organizações como o FDA e a OMS, regulamentam e recomendam os níveis de arsênio em torno de 1 mg/Kg. A Cetesb definiu em relatório oficial níveis de As presente em solo e águas subterrâneas, com valores orientadores em torno de 3,50 mg/Kg e 10 µg/L, respectivamente (CETESB, 1999).

Tabela 1. Limites máximos de tolerância de arsênio em diversos alimentos.

Categoria	Quantidade permitida (mg/Kg)
Gorduras vegetais	0,1
Gorduras e emulsões refinadas	0,1
Gorduras hidrogenadas	0,1
Açúcares	1,0
Caramelos e balas	1,0
Bebidas alcoólicas fermentadas	0,1
Bebidas alcoólicas fermento-destilladas	0,1
Cereais e produtos a base de cereais	1,0
Gelados comestíveis	1,0
Ovos e produtos de ovos	1,0
Leite fluído, pronto para o consumo	0,1
Mel	1,0
Peixe e produtos de peixe	1,0
Produtos de cacau e derivados	1,0
Chá, mate, café e derivados	1,0

FONTE : Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998.

2.8 Metodologia analítica

Alguns procedimentos de separação e determinação de arsênio são baseados em métodos de destilação e precipitação de sulfetos de hidrogênio. O método gravimétrico é bastante relatado na literatura o qual consiste na medida do arsênio através da extração de As como AsCl_3 com benzeno em ácido clorídrico. O teste de Mash, descrito na literatura, é um método qualitativo baseado na geração de arsina (AsH_3) pela adição de grânulos de zinco e ácido sulfúrico. O gás é misturado com o hidrogênio e conduzido ao tubo de vidro aquecido, e se decompõe em hidrogênio e arsênio metálico que é depositado e forma um espelho de cor preto - amarronzado na parte aquecida do tubo (WHO,2001; YABIKU *et al.*,1989)

GEORGE *et al.*,1973 apresenta um estudo colaborativo para a medida colorimétrica de arsênio em tecidos de aves comestíveis e suínos

usando o dietilditiocarbamato de prata (AgDDTC) como um agente complexante. O limite de detecção foi 0,1 mg/Kg nos tecidos. O teste de Gutzeit, relatado na literatura é baseado na geração de arsina e compostos de arsênio pela adição de zinco granulado em ácido sulfúrico concentrado (WHO,2001)

Os métodos estudados neste trabalho são a Espectrometria no UV/Visível e a Espectrometria por absorção atômica com gerador de hidretos.

2.8.1 Técnicas analíticas para determinação de arsênio total em alimentos

Os métodos por absorção atômica podem ser por chama (FAAS), absorção atômica eletrotérmica (ETAAS) e geração de hidretos (HGAAS). O FAAS é relativamente menos sensível para a determinação de arsênio que o ETAAS e HGAAS. O limite de detecção é em microgramas por litro e tem uma aplicação limitada, especialmente para amostras biológicas (HERSHEY *et al*,1988; WHO,2001).

O HGAAS é provavelmente o método mais usado para a determinação de arsênio em diversas matrizes. Entretanto o erro relatado na determinação de arsênio pelo HGAAS com borohidreto de sódio (NaBH_4) pode ser atribuído a variação na produção do hidreto formado e no transporte ao atomizador (FEDOROV *et al.*,1997; HERCE-PAGLIAI *et al.*, 2002; WHO, 2001).

Na determinação de arsênio total, arsenito e arsenato em alimentos por HGAAS, com extração prévia com clorofórmio, apresentou uma recuperação maior que 80%. Este procedimento também tem sido estudado para especiação de compostos arseniais em diversos substratos. Esta técnica pode também ser aplicada em produtos cárneos, à partir da

mineralização por via seca, apresentando um limite de detecção de 0,017 µg /g de arsênio com uma precisão de 3% (WHO,2001).

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) tem sido usada na detecção de hidretos de arsênio na região espectral do ultravioleta, por causa da pequena emissão de fundo produzida pela difusão da chama de hidrogênio. As espécies de arsênio em águas marinhas tem sido medidas usando gerador de hidretos e vapor frio, acoplado com detector AFS à 193 nm . Os limites de detecção foram 2,3; 0,9; 2,4 e 3,7 ng/L para arsenito, arsenato, MMA e DMA respectivamente, com precisão de 3,5% (WHO,2001).

A principal vantagem das técnicas de ICP-MS e ICP-AES são os baixos limites de detecção na ordem de picogramas e fentogramas com análises de isótopos lineares de alta precisão. O limite de detecção do ICP-AES é na ordem de nanogramas e picogramas (ACKLEY *et al.*,1999; MCKIERNAN *et al.*,1999; MUÑOZ *et al.*,1999;WHO,2001)

O método por voltametria baseia-se na redução química do As (V) para o As (III), pois o As (V) é eletroquimicamente inativo (WHO,2001).

Alguns autores relatam o uso da técnica de combustão para preparação de amostra e determinação de arsênio, selenio, zinco, cádmio e mercúrio por análise de ativação de neutron (NAA) em amostras ambientais incluindo materiais de referência certificado, onde a recuperação foi de 98 - 100 % (WHO,2001).

A Espectrometria de partícula induzida por emissão de raio-X (PIXES) é uma técnica analítica onde o bombardeamento da amostra com partículas carregadas, resulta na emissão de raios-X característicos do elemento presente. PIXES é uma técnica multielementar com um limite de detecção de aproximadamente 0,1 µg/g de arsênio. A principal vantagem é o uso de

pequenas quantidades de amostra (1mg ou menos), além de ser uma técnica não-destrutiva (WHO,2001).

O termo técnicas hifenadas se refere ao acoplamento de mais de dois sistemas instrumentais. A combinação da separação cromatográfica com elementos específicos na detecção espectrométrica tem se mostrado eficiente na especiação de compostos de arsênio ao nível de traços em amostras ambientais. Alguns trabalhos descrevem o acoplamento da cromatografia com métodos de espectrometria atômica, na especiação do arsênio, incluindo a cromatografia a gás - GC ou a cromatografia líquida de alto desempenho – HPLC, com detecção por espectrometria de absorção atômica por chama, denominada FAAS, espectrometria por fluorescência atômica com chama (FAFS) e ICP-OES. O sistema FAAS é capaz de detectar concentrações inferiores a 1 µg/Kg. HPLC- gerador de hidretos-FAAS é provavelmente o método mais simples entre as técnicas hifenadas e HPLC-gerador de hidretos-ICP-OES , é preferível para análises multi-elementar. HPLC-ICP-OES tem sido empregado para especiação de arsênio orgânico de origem aquática (ACKLEY *et al.*,1999; LI *et al.*,2003; MELO *et al.*, 1999; MOLL *et al.*, 1996; MUNOZ *et al.*,1999; WHO,2001)

Numerosos métodos tem sido desenvolvido na especiação de arsênio usando a separação cromatográfica acoplado à sensibilidade do detector ICP-MS, onde o limite de detecção para as espécies de arsênio em material de referência certificado de músculo de Dogfish DORM-1 é de 50 a 300 pg (MCKIERNAN *et al.*,1999; WHO,2001).

Vários autores utilizaram metodologias hifenadas para detectar arsênio, em algumas de suas formas, conforme mostra alguns trabalhos dispostos na Tabela 2. ACKLEY *et al.*, 1999, usaram técnicas de especiação como a espectrometria de massa acoplada a plasma induzido (ICP-MS), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com troca iônica e íons pareados; e como procedimento de extração a digestão ácida

em microondas com rampas de tempo e temperatura para verificar a purificação das espécies estudadas evitando a degradação das mesmas durante o processo de extração. Podem ser utilizados, também, diferentes meios eluentes para a determinação cromatográfica. Esses autores trabalhando com amostras certificadas DORM-2, concluíram que a extração em microondas é um método efetivo para a extração das espécies de arsênio em tecidos de peixe. Na mistura metanol:água (80:20 v/v), cada espécie investigada permaneceu intacta quando exposta ao microondas por 4 minutos à 65°C, sendo que nestas condições 100% do arsênio presente em DORM-2 foi extraído. Em todas as amostras de peixe de água salgada investigadas, a maior quantidade de arsênio encontrada foi a de arsenobetaina.

2.8.1.1 Espectrometria no ultra violeta e visível

A aparelhagem para geração de arsina usada na técnica do dietilditiocarbamato de prata é composta por: erlenmeyer de 300 mL, e uma conexão de tubo em U apropriada. Acima da conexão é preenchida com lã de vidro embebida em solução de acetato de chumbo à 10%. A reação de redução e oxidação das diversas formas de arsênio (principalmente arseniato e piroarsenato) encontrada na amostra para arsênio V, se dá em meio fortemente ácido com a adição das substâncias redutora a solução de iodeto de potássio à 15% com cloreto estânico bihidratado à 40% no erlenmeyer, onde é adicionado o zinco para favorecer a reação, onde as formas arseniais em gases reage com a solução de dietilditiocarbamato de prata em piridina e forma a arsina, conforme mostra a Figura 1, a qual resulta no composto de coloração avermelhado, cuja intensidade de cor será lida no espectrofotômetro na região do visível.

Figura 1. Aparelhagem para geração de arsina.

Fonte : ARSENIC,1995. Figura modificada

2.8.1.2 Espectrometria por absorção atômica com geração de hidretos

A técnica por geração de hidretos consiste na reação do analito em meio redutor para formação da arsina. A Figura 2 apresenta as etapas onde ocorre a leitura da amostra no FIAS 400 : a amostra é succionada por um sistema de injeção em fluxo onde é transportada pela solução carreadora (HCl) para um separador gás-líquido, onde também encontra-se a solução redutora (NaBH_4 a 0,5%), para formar a arsina e daí é transportada pelo gás argônio para uma cela de quartzo aquecida a 900 °C onde a arsina é transformada em arsênio. Assim, As é lido no espectrofotômetro de

absorção atômica. As condições de operação são apresentadas na Tabela 3. A leitura é dada em $\mu\text{g/L}$.

Figura 2. Esquema do sistema de injeção em fluxo para geração de hidretos.

Fonte : Perkin Elmer,s.d.

2.9 Digestão de amostras

A digestão das amostras para determinação de arsênio total, consiste em geral na oxidação das formas existentes em arsênio pentavalente, através de tratamento por via seca ou por via úmida.

A digestão ácida por via úmida consiste numa mistura geralmente de ácidos clorídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico com água oxigenada, para destruição da matéria orgânica e oxidação do arsênio a uma única forma, conforme foi aplicado em alguns trabalhos apresentados na Tabela 2. A digestão por via úmida pode ser realizada em sistemas fechados ou abertos, sendo que os primeiros funcionam com pressões superiores a dos sistemas abertos, obtendo-se assim, temperaturas acima daquelas de ebulição do agente oxidante à pressão ambiente, tendo como resultado um poder de oxidação maior e uma mineralização mais completa da amostra (BARRA *et al.*, 2000). Recentemente a digestão por microondas tem sido preferencialmente utilizada. Para análises de tecidos biológicos a técnica de ICP, com uma digestão parcial em ambiente fechado à baixa temperatura e pressão é suficiente para a preparação e pré-tratamento da amostra (WHO,2001).

A digestão por via seca é o método que tem sido empregado na digestão oxidativa das amostras previamente à quantificação dos analitos. O principal tratamento por via seca consiste em adicionar à amostra uma mistura de óxidos, geralmente de magnésio a fim de oxidar o arsênio a forma pentavalente, que é mais estável, com adição de celulose para evitar explosão da amostra durante calcinação (GEORGE *et al.*, 1973). Daí as amostras são queimadas em bico de bunsen, e após tratadas com óxido de magnésio para calcinação completa dos compostos orgânicos e outros interferentes tais como sulfetos. A mineralização por via seca, é um método padrão de preparação de amostras orgânicas para a determinação do arsênio. A utilização de substâncias como MgO e $Mg(NO_3)_2$ na preparação de amostras sólidas previne a perda de arsênio e aumenta a velocidade de oxidação. A sua grande desvantagem é que consome muito tempo, tornando-se inadequada para ser usada em rotina (BARRA *et al.*, 2000).

Antes da análise de especiação do arsênio é necessário, uma extração com solventes. Por exemplo, arsenito e arsenato em amostras de solo, no procedimento de extração pode ser usado ácido clorídrico e clorofórmio. Água tem sido usado na extração de compostos solúveis de arsênio no solo com tratamento ultrasônico.

Algumas formas de compostos de arsênio podem ser separadas através de extrações sequenciais. Metanol aquoso tem sido usado frequentemente na extração de espécies orgânicas de arsênio. Alguns autores descrevem o uso do ditiocarbamato bis-triflouroetil de sodio (NaFDDC) como um reagente quelante seletivo do arsênio na técnica de detecção por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia de fluido supercrítico (SFC). A primeira técnica apresentou, em análise de águas um limite de detecção de 10 µg/L de As, e a segunda pode chegar a uma sensibilidade similar após pré-concentração na razão de 100 - 1000 do complexo quelante no solvente orgânico (WHO,2001).

A Tabela 2 apresenta algumas características relacionadas aos métodos analíticos que permitem a determinação de arsênio em diversas matrizes.

Tabela 2 : Condições analíticas utilizadas na determinação de arsênio em algumas matrizes

Referência	Amostra	Tratamento da amostra	Pré-redução	Técnicas de Quantificação / Limite de Detecção
ACKLEY <i>et al</i> , 1999	Peixe, sedimento e DORM-2	Metanol : Água (80:20) Solução de hidróxido de tetrametilamônio à 5%	HNO ₃ 2% v/v	HPLC-ICP MS FI-ICP MS
FEDOROV <i>et al</i> , 1997	Peixe, frutas, chocolate, café	HNO ₃ + H ₂ O ₂ , Via úmida com decomposição pressurizada em autoclave	HCl Conc. + Uréia à 10% + KI à 5%	HG AAS
HERCE-PAGLIAI <i>et al</i> , 2002	Vinho	HNO ₃ + H ₂ O ₂	Tratamento com redutor NaBH ₄ a 1,4% em solução NaOH 1M.	HG AAS
HERSHEY e KELIHER, 1988	Peixe, tecido de ostra	HNO ₃ : H ₂ SO ₄ (1:1) HCl, HNO ₃ , HClO ₄ , H ₂ SO ₄	KI à 10% + HCl 6,6 N	HG AAS

Continuação ...

LEBLANC e JACKSON, 1973	Caranguejo, tubarão, produtos à base de peixe	Mg(NO ₃).6H ₂ O à 50% + HCl	KI à 1,5 % + SnCl ₂ .2H ₂ O	SDDC-Ag
LI <i>et al</i> , 2003	Algas, crustaceos e peixe	Metanol / água (1:1) HNO ₃ + H ₂ O ₂ (3: 2)	HNO ₃ 1%	HPLC-ICP MS
LUNDE, 1970	Peixes, crustaceos	Filtração em gel, irradiação	HBr, H ₂ SO ₄ e H ₂ O ₂	CCD
MANTOVANI e ANGELUCCI, 1992	Atum, sardinha	Mg(NO ₃).6H ₂ O + HNO ₃	HCl + Zn	SDDC-Ag
MCKIERNAN <i>et al</i> , 1999	Peixe, produtos de peixe	HNO ₃ + H ₂ O ₂ à 30%	HNO ₃ 1%	ICP MS
MAHER, 1983	Amostra certificada de Ostra	MgO / Mg(NO ₃).6H ₂ O HNO ₃ + H ₂ SO ₄	KI + Ácido Ascórbico	GF AAS
MELO <i>et al</i> , 1999	Peixes de água doce	Mg(NO ₃) ₂ à 50% + HNO ₃ + HCl 6M	Solução de KI à 50%	AAS-ICP (Limite de Detecção 6,5 µg/Kg)
MIDIO e TOMOTAKE, 1988	Caranguejo	MgO + Cellulose / Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	HCl + Zn + KI à 15% + SnCl ₂ .2H ₂ O	SDDC-Ag

Continuação ...

MOLL <i>et al</i> , 1996	Frutos do mar	Água : Metanol (1:1) H ₂ SO ₄ / HNO ₃ (2:5) H ₂ O ₂	NaBH ₄ 1% em NaOH 0,1% e H ₂ SO ₄ 0,5 mol/L	FI-HG AAS ICP OES ICP MS
MUÑOZ <i>et al</i> , 1999	DORM-1, DORM-2, peixes, moluscos, crustaceos	HCl + HBr + CHCl ₃	Solução de ácido ascórbico à 5% e KI à 5%	HG AAS HPLC-ICP MS
MUÑOZ <i>et al</i> , 2000	Produtos à base de peixe	HNO ₃ + HCl	KI + Ácido Ascórbico	FI-HG AAS
OCHSENKUHN-PETROPULU <i>et al</i> , 1997	TORT-1, DORM-1, peixe	Via úmida , metanol / Clorofórmio - HNO ₃ conc + H ₂ SO ₄	CH ₃ OH / H ₂ O	HG AAS (Limite de detecção 2 ng)
SUNER <i>et al</i> , 1999	Peixes, crustaceos, moluscos	HCl + Ácido Hidrobromico + sulfato de hidrazina + clorofórmio	KI à 5% + ácido ascórbico à 5%	FI-HG AAS

Continuação ...

YAMAMOTO <i>et al</i> , 1985	Amostras certificadas	$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HCl}$	KI à 4,2% e 0,4%	FI -HG AAS (Limite de detecção 0,2 ng)
VILLA-LOJO <i>et al</i> , 2002	DORM-2, peixe	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} +$ Na_2HPO_4 Na_3PO_4	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{NaOH}$	HPLC-MW-HG AAS (Limite de Detecção 0,3 ng)

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento de duas técnicas analíticas utilizadas na determinação de arsênio total, a do dietilditiocarbamato de prata, método espectrofotométrico de baixo custo e o de espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos (HGAAS), e determinar os teores desse metalóide em amostras de cação comercializados na cidade de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Validação de metodologia para análise de arsênio total em cação, utilizando os métodos espectrofotométrico do dietilditiocarbamato de prata e por espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos.
- Comparação das duas técnicas através do estudo de parâmetros de validação como: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e recuperação.
- Avaliação de amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo, quanto à ocorrência de arsênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Material

4.1.1 Amostras

Amostras de cação foram adquiridas, no período de janeiro de 2002 a março de 2004, em estabelecimentos comerciais, tais como supermercados, e feiras livres da cidade de São Paulo. As amostras adquiridas em postas de aproximadamente 100g, foram armazenadas em freezer até o momento da análise.

Esta pesquisa faz parte do projeto internacional de "Estimación de riesgos derivados de la presencia de metales pesados y arsénico en los alimentos" coordenado pela Dra Rosa Montoro, do laboratório de Contaminación Metálica del Departamento de Conservación y Calidad de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA/CSIC), de Valência, Espanha, aprovado pela Rede Iberoamericana de Alimentos - CYTED- (RIANTAP) ligada ao programa CYTED- Ciencia y Tecnología para el Desarrollo- Rede Íbero Americana de Evaluación Nutricional Y Toxicológica de Alimentos Processados.

4.1.2 Vidrarias

- Erlenmeyers
- Pipetas graduadas de 1, 2, e 5 mL.
- Pipetas volumétricas de 0,5 ; 1,0 e 2,0 mL.
- Bureta de 25 mL
- Proveta de 10 mL e 100 mL
- Cubetas de quartzo para espectrofotômetro
- Tubos de ensaio
- Bastões de vidro
- Balões volumétricos de 10,0; 25,0 e 50,0 mL.
- Beckeres 25, 50, 100, 150, 250 e 500 mL

4.1.3 Reagentes

- Óxido de magnésio (MgO), Synth
- Celulose microcristalina, Merck
- Nitrato de magnésio hexahidratado $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, Vetec
- Ácido Clorídrico fumegante à 37% (HCl), Merck
- Trióxido de arsênio (As_2O_3), Merck
- Iodeto de Potássio (KI), Reagen
- Ácido ascórbico L(+) - vitamina C, Merck
- L-cisteína - para bioquímica, Merck
- Iodeto de potássio (KI), Merck
- Uréia $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, Mallinckrodt
- Hidróxido de sódio (NaOH), Merck
- Borohidreto de sódio (NaBH_4), Merck
- Cloreto estânico bihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck
- Zinco granulado (Zn) - 3-8 mm, Synth
- Dietilditiocarbamato de prata (DDC-Ag), Merck
- Piridina, Merck
- Acetato de Chumbo, Merck

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A).

4.1.4 Material de referência certificado (MRC)

As análises por espectrometria de absorção atômica foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz - Setor de Equipamentos Especializados, responsável pelas análises de contaminantes inorgânicos. Os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho foram os seguintes:

- Oyster tissue 1566 a - Standard Reference Material - U.S. Department of commerce- National Bureau of Standards - Gaithersburg, MD 20899.

- Albacore tuna 50 - NBS - research Material - 50 U.S. Department of commerce - National Bureau of Standards - Washington, D.C. 20234
- Fish Flesh Homogenate - No. 963 IAEA/ Mônaco

4.1.5 Solução padrão

- **Solução padrão de trióxido de arsênio (As_2O_3)**

Solução padrão estoque com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$:

Foi dissolvido 0,660g de As_2O_3 em 25 mL de uma solução de hidróxido de sódio à 10%, diluída para 1(um) litro de água destilada e desionizada e armazenada em freezer (GEORGE *et al.*, 1973; LEBLANC e JACKSON, 1973).

Solução padrão intermediária com 10 $\mu\text{g/mL}$:

Foi diluído 10 mL da solução padrão estoque em balão de 500 mL e avolumado com água destilada e desionizada. Esta solução era preparada a cada análise.

Solução padrão de trabalho de 100 $\mu\text{g/L}$ para leitura no Absorção Atômica:

Foi diluída uma solução de As com 10 $\mu\text{g/mL}$, fornecida pela Perkin Elmer, onde foi tomado uma alíquota de 1 mL e diluído em balão de 100 mL, e avolumado com água destilada e desionizada.

4.1.6 Soluções

- Solução de ácido clorídrico a 10%, v /v
- Solução de iodeto de potássio a 15%, p/v
- Solução de iodeto de potássio a 5%, p/v

- Solução de cloreto arsenioso a 40% diluído em HCl concentrado, p/v
- Solução de ácido clorídrico 6N
- Solução de dietilditioicarbamato de prata a 0,5% diluído em piridina.
- Solução de acetato de chumbo a 10% p/v
- Solução de ácido ascórbico a 5% , p/v
- Solução de uréia a 10%, p/v
- Solução de borohidreto de sódio a 0,5% diluído (NaBH_4) em solução de hidróxido de sódio a 0,5%, p/v
- Solução de Iodeto de Potássio (KI) a 15 %.
- Água utilizada no preparo das soluções e padrões foi destilada e desionizada com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$.

4.1.7 Equipamentos e acessórios

- Aparelho especial para evolução de Arsina, composto por erlenmeyer e conexão em U apropriada
- Espectrofotômetro BAUSH & LOMB
- Espectrofotômetro UV VISÍVEL SHIMADZU MINI 1240
- Mufla, INDÚSTRIA FORLABO LTDA
- Pipeta automática, volume variável de 1-5 mL e 200 a 1000 μL , modelo FINNPIPETTE, LABSYSTEMS.
- Balança analítica, SARTORIUS RESEARCH
- Espectrofotômetro de absorção Atômica ANALYST 100, Perkin Elmer
- Gerador de hidretos FIAS 400 , Perkin Elmer
- Microondas doméstico, com potência de 900 W

4.2 Métodos para determinação de arsênio total

4.2.1. Mineralização das amostras por via seca

As amostras de cação previamente homogeneizadas, passaram por um procedimento de mineralização por via seca, realizado conforme descrito, a seguir:

Em uma cápsula de porcelana foi pesado analiticamente cerca de 5,0000 g da amostra e adicionado 3,0 g de MgO, 6,0 g de celulose em pó, e acrescentado 25,0 mL de água destilada e desionizada. A mistura foi homogeneizada na cápsula de porcelana e levada à estufa à 80°C para secar, e posteriormente queimada em bico de Bunsen, até a completa eliminação da fumaça. Após esfriamento espontâneo, foi adicionada 5,0 mL de uma solução de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 60%, adicionada cerca de 10 mL de água e levado à estufa para secar, e novamente queimada em bico de Bunsen para eliminar os vapores de NO. Posteriormente, foi levada à mufla para calcinação por 6 horas, onde a temperatura foi elevada gradativamente até 535 °C, para obtenção de cinzas brancas.

4.2.1.1 Técnica da espectrofotometria na região do visível com dietilditiocarbamato de prata

As análises para determinação de arsênio total em cação, seguiram a técnica de mineralização por via seca, conforme o descrito no item 4.2.1. A determinação espectrométrica no visível, foi realizada de acordo com o preconizado por LEBLANC e JACKSON, 1973 e GEORGE *et al.*, 1973.

Após esfriamento espontâneo das cinzas brancas, foi adicionado água destilada e desionizada e a mistura transferida quantitativamente para o erlenmeyer gerador de arsina, contendo 90 mL de HCL 6 N, perfazendo um volume total de 175 mL. Em seguida foi adicionado 2,0 mL de solução de KI à 15 %; 1,0 mL da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 40% em HCL concentrado, e a mistura foi agitada cuidadosamente. Com uma bureta, foi colocado 5,0 mL da solução de DDC-Ag em piridina, na curva ascendente do tubo em U, da conexão com o frasco gerador, conforme Figura 1. Foi

acrescentado à mistura, 5,0 g de zinco granulado, vedando-se o erlenmeyer imediatamente com o tubo em U. Após uma hora, a solução de DDC-Ag foi transferida para a cubeta de leitura do espectrofotômetro e sua absorbância lida no comprimento de onda de 540 nm. Foi usado, como referência um branco dos reagentes.

A cada experimento foram construídas curva padrão utilizadas na quantificação das amostras.

4.2.1.2 Preparo da curva padrão

Alíquotas da solução padrão de trabalho contendo 10 µg/mL de arsênio e foram transferidas, aos erlenmeyers a fim de obter as respectivas massas de 5 a 20 µg, onde foram adicionados 90 mL de solução de ácido clorídrico 6 N e o volume completado para 175 mL com água destilada e desionizada. Foram adicionados 2,0 mL de solução de KI à 15% e 1,0 mL da solução $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 40% em HCl concentrado, agitando-se cuidadosamente. Com o uso de uma bureta, foi colocado 5,0 mL da solução de DDC-Ag em piridina, na curva ascendente do tubo em U (aparelho gerador de arsina), da conexão com o frasco gerador, conforme Figura 1. Foram acrescentados 5,0 g de zinco granulado ao erlenmeyer, vedando imediatamente ao aparelho gerador de arsina. Após uma hora do desenvolvimento da reação, a solução de DDC-Ag foi transferida para a cubeta de leitura do espectrofotômetro e sua absorbância lida a 540 nm. Um branco de reagentes foi usado, como referência. As concentrações das amostras foram calculadas, à partir da reta obtida do gráfico da concentração x absorbância.

A Figura 3 ilustra a marcha analítica utilizada no procedimento para a mineralização por via seca das amostras de peixe e posterior quantificação pelo método espectrofotométrico pelo dietilditiocarbamato de prata.

Figura 3. Fluxograma da análise de arsênio pelo método do dietilditiocarbamato de prata.

4.2.2 Método por espectrometria por absorção atômica com geração de hidretos

4.2.2.1 Mineralização das amostras por via seca

A mineralização por via seca seguiu o procedimento descrito no item 4.2.1. Após esfriamento espontâneo, foram adicionados às cinzas 20mL de ácido clorídrico concentrado, transferidos quantitativamente para o balão volumétrico de 100 mL e avolumados com água destilada e desionizada. Para leitura no HGAAS as amostras passaram por um procedimento de pré-redução do arsênio As^{5+} para As^{3+} e em seguida foi reduzido a AsH_3 e vapor de As^0 .

Visando determinar arsênio total em cação foram avaliadas três técnicas de pré-redução: com iodeto de potássio (KI) à 5% e ácido ascórbico à 5% (YAMAMOTO *et al.*, 1985); com L-cisteína à 5% (HOWARD e SALOU, 1996); e com uréia à 10% e iodeto de potássio à 5% (FEDOROV *et al.*, 1997). Nestes ensaios foram utilizados material de referência certificados descritos no item 4.1.4.

4.2.2.1.1 Redução com L- cisteína

Após dissolução das amostras, descrita no item 4.2.2.1, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para balão volumétrico de 25,0 mL; foram adicionados 5 mL da solução de L-Cisteína à 5% dissolvida em ácido clorídrico 0,03 M (HOWARD e SALOU, 1996); e deixadas em repouso por 50 minutos e posteriormente, avolumada com a solução de ácido clorídrico 0,03 M e lida no HGAAS.

4.2.2.1.2 Redução com uréia

Após dissolução das amostras, descrita no item 4.2.2.1, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para balão volumétrico de 25,0 mL; foram adicionados 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado; deixada em repouso por 30 minutos e posteriormente foi adicionado 2,5 mL de uma solução de uréia à 10% e 2,5 mL de uma solução de iodeto de potássio à 5% (FEDOROV *et al.*, 1997). A mistura permaneceu em repouso durante 50 minutos e posteriormente foi avolumada com água destilada e desionizada e lida no HGAAS.

4.2.2.1.3 Redução com iodeto de potássio e ácido ascórbico

Após dissolução das amostras, descrita no item 4.2.2.1, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para balão volumétrico de 25,0 mL; foram adicionados 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado, 2,5 mL de uma solução de iodeto de potássio à 5% e 2,5 mL de ácido ascórbico à 5% (YAMAMOTO *et al.*, 1985). A mistura foi deixada em repouso durante 50 minutos e posteriormente avolumada com água destilada e desionizada e lida no HGAAS.

4.2.3 Preparo da curva padrão

4.2.3.1 Redução com L - cisteína

A curva de calibração (5 pontos) foi construída com concentrações de arsênio de 1,0 a 10,0 µg/L em água destilada e desionizada de uma solução do padrão com 100 µg/L de arsênio, adicionadas em balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 10 mL da solução de L-Cisteína à 5% dissolvida em ácido clorídrico 0,03 M, em balão volumétrico de 50 mL (HOWARD e SALOU, 1996). As misturas foram deixadas em repouso durante 50 minutos e posteriormente avolumado com uma solução de ácido clorídrico 0,03 M e lidas no HGAAS.

4.2.3.2 Redução com uréia

A curva de calibração (7 pontos) foi construída com concentrações de arsênio de 1,0 à 20,0 µg/L em água destilada e desionizada, de uma solução do padrão com 100 µg/L adicionadas em balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado, e após repouso de 30 minutos foram adicionados, 5,0 mL de uma solução de uréia à 10% e 5,0 mL de uma solução de iodeto de potássio à 5% (FEDOROV *et al.*, 1997). A mistura foi deixada em repouso durante 50 minutos e posteriormente avolumado com água destilada e desionizada e lidos no HGAAS.

4.2.3.3 Redução com iodeto de potássio e ácido ascórbico

A curva de calibração (7 pontos) foi construída com concentrações de arsênio de 1,0 à 20,0 µg/L em água destilada e desionizada, de uma solução do padrão de 100 µg/L, adicionadas em balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado, 5,0 mL de uma solução de iodeto de potássio à 5% e 5,0 mL de ácido ascórbico à 5% (YAMAMOTO *et al.*, 1985); foi deixada em repouso por 50 minutos e posteriormente avolumado com água destilada e desionizada e lidos no HGAAS.

A Figura 4 ilustra o procedimento utilizado na mineralização por via seca das amostras de cação e posterior quantificação pelo método espectrométrico por absorção atômica com gerador de hidretos.

Figura 4. Marcha analítica da determinação de arsênio por absorção atômica com gerador de hidretos.

4.2.4. Determinação espectrométrica na absorção atômica com gerador de hidretos

As amostras submetidas aos tratamentos descritos nos itens 4.2.2.1. a 4.2.3.3. foram analisadas por absorção atômica com geração de hidretos nas condições apresentadas na Tabela 3 .

Tabela 3 . Condições de operação do FIAS - HGAAS

Gerador de hidretos		Condições de Operação	
Célula de quartzo		900 °C	
Solução redutora		Solução a 0,5% (p/v) de NaBH ₄ em	
		0,5% (p/v) NaOH	
Solução carregadora		Solução á 10% (v/v) HCl	
Gás de arraste		Argônio 20 mL/min fluxo contínuo	
Volume de reação		500 µL	
Espectrofotômetro de absorção atômica		Condições de operação	
Comprimento de onda		193,7 nm	
Fenda		0,7 nm	
Corrente da lâmpada EDL		380 mA	

4.2.5 Material de Referência Certificado (MRC) :

Para avaliar os parâmetros de validação (exatidão, limites de detecção e quantificação e recuperação) do método por HGAAS foram utilizados materiais de referência certificados seguindo os procedimentos descritos nos itens 4.2.2.1 a 4.2.3.3.

4.3 Parâmetros de validação

No método do dietilditiocarbamato de prata foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: recuperação, linearidade, limites de detecção e quantificação.

Para avaliar a confiabilidade do método por HGAAS foram utilizados para a determinação de arsênio total nas amostras de cação, os seguintes parâmetros de validação: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e exatidão.

4.3.1 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra, conforme define o trabalho CHASIN *et al.*, 1998. Para o método com dietilditiocarbamato de prata, foram adicionados volumes de solução padrão de As com 10 µg/mL, de tal forma a obter massas com 5, 10, 15 e 20 µg de arsênio, a cada amostra de cação, com 5,0000 g, pesadas com exatidão. Foi aplicado o procedimento descrito no item 4.2.1 e 4.2.1.1. Foi também avaliada a recuperação do material de referência certificado de ostra (Oyster tissue 1566 a - Standard Reference Material - U.S. Department of commerce- National Bureau of Standards - Gaithersburg, MD 20899).

O percentual de recuperação foi encontrado utilizando a fórmula segundo CHASIN *et al.*, 1998 :

$$\text{RECUPERAÇÃO \%} = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{Valor adicionado}} \times 100$$

A recuperação do As no material de referência certificada foi avaliada por comparação entre a concentração obtida da amostra certificada submetida ao procedimento analítico e a concentração nominal da amostra

certificada. As análises foram realizadas conforme descrito em 4.2.1 e 4.2.2.1.2.

O percentual de recuperação foi encontrado utilizando a fórmula segundo CHASIN *et al.*, 1998 :

$$\text{RECUPERAÇÃO \%} = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{Valor certificado}} \times 100$$

4.3.2. Linearidade

A linearidade é determinada pela análise de concentrações conhecidas e diferentes de uma solução onde abrange, a faixa de concentração de interesse no trabalho (CHASIN *et al.*, 1998). A linearidade do método por dietilditiocarbamato de prata foi avaliada a partir de uma solução padrão de trabalho de arsênio com 10 µg/mL com volumes contendo massas que variavam de 0,25 à 20 µg em 4 replicatas segundo o procedimento descrito em 4.2.1 e 4.2.1.1.

Para o método por HGAAS a linearidade foi determinada pela análise de 7 soluções padrão de arsênio nas concentrações variando de 1,0 à 20,0 µg/L que abrangiam a faixa de concentração de interesse do trabalho (CHASIN *et al.*, 1998), conforme descrito no item 4.2.3.

4.3.3 Limite de detecção

O limite de detecção, é definido como o menor valor de concentração do analito que pode, com alguma certeza estatística, ser detectado, mas não quantificado pelo método. Este é um parâmetro fundamental para medidas obtidas em níveis muito baixos, como nas análises de resíduos de contaminantes em alimentos (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003) as análises foram realizadas com 5 replicatas, conforme descrito no item 4.2.1 e 4.2.1.1, para o método do dietilditiocarbamato de prata.

A fim de estabelecer o limite de detecção (LD) na análise de As por HGAAS foram realizadas 6 leituras dos respectivos brancos preparados independentes, conforme os itens 4.2.1 e 4.2.2.1.2 com os quais pode-se obter o desvio padrão (DP). Foi o limite de detecção desejado, através da seguinte fórmula (INMETRO, 2003):

$$LD = \bar{X} + ts$$

Onde :

LD = Limite de detecção

$\bar{X}$ = Média dos valores dos brancos

s = Desvio padrão

t = valor da abscissa t-Student para 95% de confiança, adotado o valor de 2,01.

4.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação, é definido como a menor concentração que se pode medir com precisão adequada segundo CHASIN *et al.*, 1998. Para a determinação do limite de quantificação, pode-se utilizar os dados de desvio padrão obtidos no cálculo do limite de detecção, alterando o fator de multiplicação de 3 para 5, 6 e 10, dependendo da incerteza desejada (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003). Para essa determinação foram avaliadas 5 replicatas conforme descrito no item 4.2.1 e 4.2.1.1.

A fim de estabelecer o limite de quantificação (LQ) na análise de As por HGAAS foram realizadas 6 leituras dos respectivos brancos preparados independentes, conforme os itens 4.2.1 e 4.2.2.1.2, com os quais pode-se obter o desvio padrão (DP). Foi calculado o limite de quantificação desejado, através da seguinte fórmula (INMETRO, 2003):

$$LQ = \bar{X} + 10s$$

LQ = Limite de quantificação
 $\bar{X}$ = Média dos valores dos brancos
 s = Desvio padrão dos brancos

4.3.5 Exatidão do método analítico

A exatidão do método por HGAAS foi avaliada através da análise dos materiais de referencia certificados conforme os itens 4.2.1 e 4.2.3.2, e, comparando-se os resultados obtidos com os valores certificados.

Na avaliação da exatidão foi utilizado o índice z “z score” (INMETRO,2003) estabelecido à partir da fórmula :

$$Z = \frac{(X_{\text{tab}} - X_v)}{s}$$

Onde:

X_{tab} = valor obtido

X_v = valor certificado do MRC

s = unidade de desvio (incerteza do MRC)

A avaliação pode ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação :

$|Z| \leq 2$ = satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$ = questionável

$|Z| > 3$ = insatisfatório

4.4 Avaliação da interferência do cozimento das amostras por forno de microondas, previamente à mineralização

Vinte replicatas de uma mesma amostra de cação in natura foram pesadas com exatidão (5,0000g), e submetidas a análise pelo método descrito em 4.2.2.1 e 4.2.2.1.2, sendo que 10 delas, após a pesagem, foram cozidas em microondas, afim de avaliar a interferência do cozimento por microondas na determinação do teor de arsênio total.

4.5 Avaliação da interferência da concentração do magnésio usado na mineralização das amostras, para determinação do As total por HGAAS.

Para avaliar a interferência da concentração do magnésio na leitura de As pelo HGAAS foi preparada uma solução de 20800 mg/L de magnésio e foram aliqüotados volumes equivalentes a 1000, 2000, 4000, 8000 e 10 000 mg/Kg adicionados a uma concentração de 5 µg/L de arsênio e seguido o procedimento descrito em 4.2.3.2. e 4.2.3.3.

4.6 Amostras avaliadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata

Foram analisadas 18 amostras de cação, obtidas em feiras livres e supermercados da cidade de São Paulo, conforme o procedimento descrito no item 4.2.1 e 4.2.1.1.

4.7 Determinação do teor de As nas amostras de cação por absorção atômica

Foram analisadas 9 amostras de cação, obtidas em feiras livres e supermercados da cidade de São Paulo, pelo método descrito em 4.2.2.1 e 4.2.2.1.2.

4.8 Análises estatísticas

Para análise estatística dos resultados foram utilizados os parâmetros da estatística descritiva como média, desvio padrão , mediana, percentil de 25%, percentil de 75 % , a análise do diagrama de blocos BOXPLOT, e o teste de Krukai-Wallis.(FISHER e VAN BELLE,1993; BERQUÓ,SOUZA e GOTLIEB, 1981) e o software statistica 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização do método do dietilditiocarbamato de prata

5.1.1 Recuperação:

Os resultados do estudo de recuperação pelo método do DDC-Ag para o arsênio em peixes são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Recuperação do arsênio em cação pelo método do dietilditiocarbamato de prata.

Massas de As em µg adicionada à amostra	Concentração total obtida em µg	Recuperação (%)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
0	5,76	-	0,41	7,25
5	2,08	41,60	0,83	10,67
10	2,52	25,14	1,04	12,63
15	8,19	54,60	1,23	8,83
20	10,80	53,99	5,64	34,06

A recuperação do MRC de ostra, cujo teor é de 14 mg/Kg, foi de 6,12 mg/Kg, e correspondeu a uma recuperação de 43,71%, com desvio padrão de 0,48 e coeficiente de variação de 7,82%.

5.1.2 Linearidade

A Figura 5 ilustra a linearidade obtida pelo método do dietiltiocarbamato de prata em piridina, descrito no item 4.2.1., nas concentrações de 5,0 ; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/5mL de As .

Figura 5. Representação gráfica da curva de calibração de As pelo método do dietilditiocarbamato de prata (5 a 20 μ g/5mL)

A Figura 6 ilustra a linearidade obtida pelo método do dietilditiocarbamato de prata em piridina, descrito no item 4.2.1. com concentrações de As de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μ g/5mL.

Figura 6. Representação gráfica da curva de calibração de As pelo método do dietilditiocarbamato de prata (0,25 a 10,0 μ g / 5mL).

5.1.3 Limite de detecção

O limite de detecção do método para a determinação de As em cação pelo DDC-Ag foi de 0,25 $\mu\text{g}/5\text{mL}$, apresentando um coeficiente de variação de 12,77% e desvio padrão de 0,03.

5.1.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a determinação de As em cação pelo DDC-Ag foi de 0,50 $\mu\text{g}/5\text{mL}$, apresentando um coeficiente de variação de 10,75 % e desvio padrão de 0,05.

5.1.5 Determinação dos teores de As em cação

A Tabela 5 apresenta os resultados de As em cação obtidos pelo método descrito em 4.2.1 e 4.2.1.1.

Tabela 5. Teores de As total em amostras de cação, analisadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata.

Amostras	Local de Aquisição	Concentração (mg/Kg)	Desvio Padrão	C. V.(%)
01	Feira Livre	1,54	0,05	3,42
02	Supermercado	0,44	0,04	10,12
03	Feira Livre	0,23	0,01	7,18
04	Supermercado	0,17	0,00	3,45
05	Feira Livre	1,11	0,09	8,70
06	Mercado Público	0,69	0,06	8,73
07	Supermercado	0,27	0,05	19,70
08	Supermercado	1,06	0,12	11,85
09	Supermercado	0,23	0,00	2,58
10	CEAGESP	0,54	0,00	0,40
11	Supermercado	1,32	0,00	0,57
12	Feira Livre	0,78	0,11	14,03
13	Feira Livre	0,79	0,21	26,61
14	Peixaria	1,00	0,15	15,31
15	Feira Livre	1,30	0,25	19,79
16	Supermercado	1,31	0,02	1,55
17	CEAGESP	3,79	0,18	4,95
18	Supermercado	2,91	0,06	2,10

CEAGESP - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo

5.2 Resultados obtidos na análise com o método espectrométrico por absorção atômica com gerador de hidretos

5.2.1 Resultados referentes às amostras certificadas analisadas pelo método da L- cisteína

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do material de referência certificados usando na pré redução L- Cisteína, conforme descrito no item 4.2.2.1.1.

Tabela 6. Resultado das amostras de material de referência certificado usando L-Cisteína na pré-redução, e leitura pela técnica, por HGAAS.

Amostra	n	Média	Desvio	C.V.	Valor	Recuperação
	replicatas		padrão	(%)	Certificado	(%)
		(mg/Kg)			(mg/Kg)	
Ostra	3	9,73	0,01	0,1	14 ±1,2	69,51
Fish	3	1,76	0,05	2,87	2,6 ± 0,5	67,78
Flesh						
Albacore	2	1,66	0,05	3,57	3,3 ± 0,4	50,40
tuna						

5.2.2 Resultados referentes as amostras certificadas analisadas pelo método da uréia

A Tabela 7 apresenta os resultados das amostras certificadas na avaliação da redução com uréia, descrita no item 4.2.2.1.2.

Tabela 7. Resultados das amostras de material de referência certificados analisadas pelo método de pré-redução com Uréia, por HGAAS.

Amostra	n (replicatas)	Média (mg/Kg)	Desvio padrão	C.V. (%)	Valor Certificado (mg/Kg)	Recuperação (%)
Ostra	3	13,28	1,06	8,05	14 ± 1,2	94,9
Fish Flesh	3	1,79	0,08	4,43	2,6 ± 0,5	69,0

5.2.3 Resultados referentes às amostras certificadas analisadas pelo método do iodeto de potássio e ácido ascórbico

A Tabela 8 apresenta os resultados das amostras certificadas na avaliação da pré-redução pelo método do iodeto de potássio e ácido ascórbico, por HGAAS (YAMAMOTO *et al.*, 1985)

Tabela 8. Resultados das amostras de material de referência certificados analisadas pelo método de pré-redução com Iodeto de Potássio e ácido ascórbico, e determinação por HGAAS.

Amostra	n(replicatas)	Média (mg/Kg)	Desvio padrão	C.V. (%)	Valor Certificado (mg/Kg)	Recuperação (%)
Ostra	3	11,66	0,86	7,42	14 ± 1,2	83,4
Fish Flesh	3	1,75	0,18	10,33	2,6 ± 0,5	67,7

5.2.4 Resultados das curvas de calibração dos métodos da L- cisteína, uréia e iodeto de potásio e ácido ascórbico

As curvas padrão com os três métodos de pré-redução, utilizando L- cisteína; uréia; e iodeto de potásio e ácido ascórbico-, obtendo-se os r^2 -coeficiente de determinação de 0,9986; 0,9942 e 0,9892, respectivamente. As Figuras 7, 8 e 9 ilustram essas determinações.

Figura 7. Curva de calibração de arsênio total, usando L-Cisteína na pré-redução.

Figura 8. Curva de calibração de arsênio total, usando uréia na pré-redução.

Figura 9. Curva de calibração de arsênio total, usando KI e Ácido ascórbico na pré-redução.

5.2.5 Validação do método analítico :

5.2.6 Limite de detecção

O limite de detecção do método para a determinação de As total em cação por HGAAS foi de 0,93 µg/L, com uma média de 0,79 e desvio padrão de 0,07.

5.2.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a determinação de As total em cação por HGAAS foi de 1,49 µg/L.

5.2.8 Exatidão do método

Na Tabela 9 são apresentados os resultados de arsênio nas amostras certificadas, utilizadas na determinação da exatidão pelo método da uréia, por HGAAS.

Tabela 9. Resultados das amostras certificadas, utilizadas na determinação da exatidão pelo método da uréia, por HGAAS.

Amostra	Método	n *	Média (mg/Kg)	Desvio padrão	C.V. (%)	Valor certificado (mg/kg)	Inexatidão (%)
Ostra	Uréia	7	15,85	1,34	8,47	14 ± 1,2	13,26 %
Albacore Tuna	Uréia	7	3,25	0,25	7,69	3,3 ± 0,4	- 1,3 %

n = número de replicatas

Os resultados do índice *z* para a amostra de ostra foi de 1,54, enquanto para o albacore tuna 0,125 ambos inferiores a 2 e, portanto, considerados satisfatórios.

5.2.9 Interferência do cozimento das amostras em forno de microondas, previamente à mineralização

Os resultados dos teores de As obtidos sem e com prévio cozimento das amostras em forno de microondas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados dos teores de As total , por HGAAS, em amostra de cação (10 replicatas) analisada sem e com prévio cozimento em microondas.

Amostra	Amostra in natura [mg/Kg]	Amostra in natura cozida em microondas [mg/Kg]
1	9,97	12,83
2	13,03	12,98
3	13,91	6,31
4	14,64	10,31
5	14,68	12,19
6	11,07	10,46
7	12,08	12,97
8	10,60	11,31
9	11,49	9,74
10	11,72	9,31
Média	12,32	10,84
Desvio	1,67	2,09
C.V.	13,56	19,33

5.2.10 Estudo da interferência do magnésio usado na mineralização para determinação de As total

A Figura 10 apresenta o gráfico da interferência dos teores crescentes de magnésio na determinação do As.

Figura 10. Interferência do magnésio, usado na mineralização, na determinação de As total por HGAAS .

5.2.11 Teores de As total em amostras de cação analisados pelos métodos do dietilditiocarbamato de Ag e por HGAAS

A Tabela 11 apresenta os resultados dos teores de As em cação analisado tanto pelo método do dietilditiocarbamato de Ag, como por HGAAS.

Tabela 11. Teores de As, em mg/Kg em amostras de cação analisadas pelos métodos do dietilditiocarbamato de prata (DDC-Ag) e por absorção atômica com gerador de hidretos e respectivos desvios padrão e C.V.

Local de aquisição das amostras	HGAAS Uréia			DDC-Ag		
	Média (mg/Kg)	Desvio padrão	C.V. (%)	Média (mg/Kg)	Desvio Padrão	C.V. (%)
Supermercado	4,09	0,14	3,66	0,44	0,04	10,12
Feira Livre	1,60	0,05	3,71	0,23	0,02	7,18
Supermercado	0,62	0,02	4,38	0,17	0,06	3,45
Feira Livre	5,46	0,02	0,42	1,11	0,09	8,70
Supermercado	1,43	0,08	6,25	0,27	0,05	19,70
Peixaria	4,67	0,23	5,07	1,00	0,15	15,31
Feira Livre	3,74	0,41	11,17	1,30	0,25	19,79
Supermercado	3,75	0,47	12,64	1,31	0,02	1,55
CEAGESP	9,54	1,01	10,63	3,79	0,18	4,95

5.3 Análises estatísticas

5.3.1 Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total, pelo método do dietilditiocarbamato de prata

No diagrama em blocos (Figura 11) estão representados os valores mostrados na Tabela 5, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 11. Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total nas amostras de cação analisadas pelo método do dietilditiocarbamato de prata.

5.3.2 Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT, dos teores de As total, em amostra de cação cru e cozido em microondas, pelo método do HGAAS.

No diagrama em blocos (Figura 12) estão representados os valores apresentados na Tabela 10, a fim de mostrar a interferência do cozimento em forno de microondas no teor de As .

Figura 12. Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total na amostra de cação cru e cozido em microondas.

5.3.3. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT, dos teores de As total, em amostras de cação analisadas pelos métodos DDC-Ag e HGAAS.

No diagrama em blocos (Figura 13) estão representados os valores apresentados na Tabela 11, a fim de comparar os resultados de amostras analisadas pelos métodos DDC-Ag e HGAAS.

Figura 13. Diagrama em blocos dos resultados da análise de As total em cação pelos métodos DDC-Ag e HGAAS

5.3.4. Representação gráfica da dispersão dos teores de As total, em amostras de cação analisadas pelos métodos HGAAS e DDC-Ag.

Na Figura 14 estão representados os valores apresentados na tabela 11, a fim de mostrar a dispersão dos resultados de amostras analisadas pelos métodos HGAAS e DDC-Ag.

Figura 14 : Gráfico da dispersão dos resultados das amostras analisadas pelos métodos de HGAAS.e DDC-Ag.

6. DISCUSSÃO

As amostras utilizadas para análise de cação, foram adquiridas em postas com cerca de 100 g, em feiras livres e supermercados da cidade de São Paulo. Assim, não houve a possibilidade de um levantamento das espécies de cação da qual se originavam, nem quanto ao comprimento e peso. Entretanto MORALES-AIZPURÚA *et al*,1999, ao pesquisarem mercúrio em cação, relataram algumas espécies comestíveis que habitam a costa brasileira, inclusive na região sudeste, a citar: cação azul (*Prionace glauca*), Caçoa (*Odontaspis*), Anequim (*Isurus*). Esses autores consideraram que os cações são predadores de vida longa e o teor de mercúrio pode ser influenciado pela idade, crescimento, alimentação, área geográfica, voracidade e características migratórias, entre outros fatores. CHICOUREL *et al*,1995, pesquisaram mercúrio em cação-azul (*Prionace glauca*) e afirmaram que, os cações têm a concentração de mercúrio em função de parâmetros como idade, alimentação e área geográfica. Sendo animais de vida longa, acumulam mercúrio cujos níveis aumentam progressivamente, podendo haver correlação entre o metal e o peso ou tamanho da espécie. Os fatores citados para cações como a idade, crescimento, alimentação, área geográfica, voracidade, migração, peso e tamanho da espécie também podem ter relação com a concentração de arsênio nos cações, visto que os resultados encontrados nesta pesquisa variaram de amostra para amostra, conforme é mostrado nas Tabelas 5 e 11.

São conhecidas algumas espécies de cação azul (*Prionace glauca*), anteriormente citado, comercializado pelo CEAGESP-SP, que podem atingir até 4 metros, geralmente entre 2 e 2,5 metros, pesando em torno de 40-60 Kg. Alimentam-se de peixes pequenos que formam cardumes, além de lulas, baleias mortas e peixes. Há populações que migram e relatos de exemplares que percorrem mais de 2.000 milhas, de Nova York à Colômbia, além de outros que cruzaram o Atlântico. As espécies Anequim (*Isurus oxyrinchus*), ingerem atuns, dourados e cardumes de peixes menores. Atingem

geralmente entre 1,8 e 2,5 metros e pesam entre 60 a 135 Kg. Sua distribuição é global, em águas temperadas e tropicais do Atlântico desde Massachusetts (EUA) à Argentina. Os Cações-anjo (*Squatina argentina*) são vorazes, e se alimentam de peixes e crustáceos. No Sul e Sudeste Brasileiro ocorrem outras espécies (CARVALHO FILHO, 1999). Os Cambeva-Pata (*Sphyrna tiburo*) ingerem crustáceos, peixes e moluscos. Migram para águas mais profundas no inverno, quando formam cardumes. Sua distribuição ocorre no Pacífico Tropical e Atlântico, desde a Nova Inglaterra ao Sul do Brasil. Apresentam outras denominações, tais como Cação-Martelo, Cambeva Redonda, Pata. Os Cabeça-Chata (*Carcharhinus leucas*) ingerem qualquer coisa que considerem alimento, desde peixes e até mamíferos, aves, crustáceos, moluscos e seus próprios filhotes. Atingem até 3,5 metros e 230 Kg, geralmente com 2,3 metros, e peso em torno de 100 Kg. Sua distribuição é global, do Atlântico Ocidental desde Nova York ao Sudeste Brasileiro. Têm outros nomes como Cação-do-Raso e tubarão-de-água-doce.

Os teores de arsênio total das amostras analisadas foram determinados em relação ao peso úmido. A umidade de algumas amostras foram determinadas, visando a comparação com os encontrados na literatura. Os teores variaram de 78 a 80 % e coincidiram com os encontrados por MUÑOZ *et al.*, 2000.

Das 18 amostras analisadas 16 foram cozidas em forno de microondas previamente ao procedimento de mineralização, visando minimizar a deterioração e facilitar o manuseio. Porém, esse procedimento acabou gerando questionamentos sobre a eventual interferência do microondas nos teores arseniais. Assim, optou-se pela determinação dos teores de As total com e sem cozimento prévio, e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 10.

A determinação de arsênio foi realizada pela técnica por absorção atômica com geração de hidretos. Os valores encontrados (Tabela 10) foram analisados estatisticamente onde foi encontrada uma média de 12,31 mg/Kg, com 10 replicatas, para as amostras in natura, com mínimo de 9,97 e máximo de 14,68 mg/Kg. As amostras cozidas apresentaram uma média de 10,84 mg/Kg, também com 10 replicatas e um valor mínimo de 6,31 e máximo de 12,98 mg/Kg. Observando o diagrama de blocos da Figura 12 podemos ver que a maioria dos valores das amostras in natura e cozida em microondas estão contidos em ambas representações gráficas. Foi aplicado também o teste estatístico de Kruskal-Wallis, não paramétrico obtendo um $p = 0,113$, que indica não haver diferença estatística significativa entre os resultados obtidos. A esses resultados aplicou-se também o teste t de student, onde não se observou variação estatística significativa, com $p > 0,05$, com 95% de confiança. Podemos com isso ressaltar que o procedimento de cozimento em microondas sem tratamento prévio não interfere estatisticamente na concentração de arsênio. As perdas durante o procedimento não são significativas.

Os resultados referentes à recuperação do método do dietilditiocarbamato de prata, apresentados na Tabela 4, foram insatisfatórios, pois apresentaram níveis que variaram de 25 à 54%. O resultado das amostras de MRC de ostra, cujo teor é de 14 mg/Kg, foi de 6,12 mg/Kg, correspondente a 43,76%, indicando também uma baixa recuperação.

Essa baixa recuperação pode estar associada ao efeito da matriz, ou mesmo à perda parcial da arsina gerada. Acredita-se que podem ocorrer perdas ao se adicionar o ácido clorídrico na dissolução da amostra mineralizada, como também, perdas por volatilização no momento da adição do zinco metálico e posterior conexão do aparelho gerador de arsina (Figura 1) e, conseqüente diminuição da formação do composto colorido em piridina. Também foi observado a formação de uma película avermelhada nas

paredes do tubo durante a formação da arsina, fato este assinalado por GEORGE *et al.*, 1973.

A recuperação observada no presente trabalho (Tabela 4) se contrapõe aos resultados obtidos por MIDIO e TOMOTAKE, 1998 que usando o mesmo método, obtiveram níveis de recuperação de 85 a 105% ao pesquisar arsênio em caranguejos.

O método do dietilditiocarbamato de prata apresentou limites de detecção de 0,05 µg/mL e quantificação de 0,1 µg/mL. A linearidade, nas massas entre 5 a 20 µg, apresentou uma equação da reta $y = 0,0234x + 0,0925$, com um coeficiente de determinação de 0,997. Visando avaliar teores mais baixos foi determinado também a linearidade nas massas de 0,25 µg à 10 µg, que apresentou uma equação da reta $y = 0,0219x - 0,0073$ e coeficiente de determinação de 0,9867. Esses resultados podem ser admitidos como adequados segundo as considerações dispostas no trabalho de CHASIN *et al.*, 1998.

Na Tabela 5 foram apresentados os resultados de arsênio total em amostras de cação, pelo método do dietilditiocarbamato de prata adquiridas em supermercados e feiras livres da cidade de São Paulo, no período de janeiro de 2002 à março de 2004, indicando níveis entre 0,17 a 3,79 mg/Kg.

A Figura 11 ilustra os dados estatísticos, onde foram obtidos os valores para mediana de 0,89, mínimo de 0,17, máximo de 3,79, variância de 0,88, percentil de 25% de 0,44 e percentil de 75% de 0,31. Dos resultados apresentado na Tabela 5, 50% dos valores obtidos estão acima de 1mg/Kg que é o teor de As admitido pela legislação brasileira, para peixe e produtos de peixe (Tabela 1).

Os resultados referentes às determinações de arsênio por HGAAS, em amostras certificadas de *ostra*, *fish flesh* e *albacore tuna* analisadas pela

pré-redução com L-Cisteína apresentados na Tabela 6, mostraram valores de: 9,73 mg/Kg para ostra, para o valor certificado de 14 mg/Kg, apresentando uma recuperação de 69,51%; para as amostras de fish flesh foram encontrados valores na ordem de 1,76 mg/Kg para um valor certificado de 2,6 mg/Kg com uma recuperação de 67,78%; para as amostras de albacore tuna foram encontrados valores de 1,66 mg/Kg para o valor certificado de 3,3 mg/Kg, com uma recuperação de 50,40%

A vantagem da L-cisteína é que ela pode ser usada em baixas concentrações em meio ácido, sendo estável e mais livre de interferência segundo comentam BARRA *et al.*, 2000 e HOWARD e SALOU,1996. As concentrações das soluções usadas para esta determinação seguiram as indicadas por HOWARD e SALOU,1996, que estudou especiação de quatro formas de As, o arsenito, arsenato, MMA e DMA, reagindo com solução de L-cisteína em meio ácido formando arsina, com controle de pH do meio, e como método de detecção o HGAAS.

Os índices de recuperação para a L- cisteína, no presente trabalho, foram inferiores a 75 %. Esta técnica de pré-redução não foi considerada adequada, pois além dos índices de recuperação serem insatisfatórios utiliza reagentes de custo elevado. Porém, com relação ao tempo de trabalho, este método tende a ser mais rápido em comparação aos outros e acredita-se possa ser melhor estudado em condições mais propícias. A linearidade foi determinada nas concentrações da solução padrão de arsênio entre 1, 2, 4, 8 e 10 µg/L, e foi encontrado um coeficiente de determinação de 0,9986, conforme ilustra a Figura 7.

Os resultados da recuperação pela técnica de HGAAS, usando amostras certificadas, pelo método da uréia (Tabela 7), foram de 94,88% para ostra e de 68,99% para *fish flesh*; As concentrações das soluções na etapa de pré-redução, seguiram o preconizado por FEDOROV *et al.*,1997, o qual analisou As total em diferentes alimentos por dois métodos de

preparação de amostras e pelas técnicas de HGAAS e GFAAS, e recomendou a técnica de HGAAS para a determinação de arsênio em gêneros alimentícios, onde um dos alimentos analisados foi camarão. Uma das preocupações utilizando esta técnica foi com relação ao uso da uréia com iodeto de potássio, e FEDOROV *et al*, 1997, também assinalou este problema, pois considerou a formação do íon iodeto I^- , onde é oxidado ao íon iodato, IO_3^- , o qual reage com $NaBH_4$ para formar o iodo, I_2 , e com isso poderia interferir nas condições de formação do hidreto de As. O presente estudo não se ateve a analisar este fato, pois os resultados obtidos com a recuperação dos MRC's analisados foi considerado satisfatório, e dessa forma, prosseguiu-se com os estudos de validação do método. A curva de calibração com pré-redução foi feita com 7 concentrações da solução padrão de As entre 1, 2, 4, 8, 10, 15 e 20 $\mu g/L$, onde encontrou-se um coeficiente de determinação de 0,9942, conforme ilustra a Figura 8.

Os índices de recuperação para a técnica de pré-redução com iodeto de potássio e ácido ascórbico com os MRC's de *ostra* e *fish flesh*, apresentados na Tabela 8, foram de 83,40% e 67,70 % para os valores certificados de 14 mg/Kg e 2,6 mg/Kg, respectivamente. Segundo BARRA *et al.*, 2000 o KI pode ser utilizado na presença de ácido ascórbico para prevenir a oxidação do iodeto pelo oxigênio atmosférico. As concentrações das soluções de KI e ácido ascórbico foram utilizadas conforme o preconizado por YAMAMOTO *et al*, 1985, e a técnica de pré-redução do método adotado pelo Laboratório de Contaminantes Inorgânicos do Setor de Equipamentos do Instituto Adolfo Lutz. A linearidade da pré-redução foi obtida com 7 concentrações da solução padrão de As entre 1, 2, 4, 8, 10, 15 e 20 $\mu g/L$, onde foi encontrado um coeficiente de determinação de 0,9892, conforme ilustra a Figura 9.

As técnicas de pré-redução que utilizaram uréia com iodeto de potássio e iodeto de potássio com ácido ascórbico foram as que apresentaram os melhores índices de recuperação para o MRC de ostra.

Contudo, foi adotado o método com uréia, por seu custo ser mais baixo em relação aos outros dois. Assim, a partir da definição do uso da uréia na pré-redução foram avaliados os parâmetros de validação obtendo-se resultados considerados adequados.

Foi observado que para o MRC *fish flesh* todos os métodos de pré-redução testados apresentaram recuperações inferiores à 70%, o que pode ser atribuído ao tempo de validade da amostra, bastante avançado, o que poderia causar um possível aumento de umidade, como também ter sua composição alterada.

Nos parâmetros de validação avaliados pela técnica por HGAAS com a pré-redução com uréia e iodeto de potássio foi encontrado um limite de detecção de 0,93 µg/L, e limite de quantificação de 1,49 µg/L. A exatidão do método foi feita com a análise dos MRC's de ostra e albacore tuna em 7 replicatas, com coeficientes de variação menores que 10%, e foram encontrados percentuais de inexatidão de 13,26% para ostra e -1,3% para albacore tuna, conforme apresentado na Tabela 9. A inexatidão, que avalia o afastamento entre os valores esperado e o obtido, está associada a erros sistemáticos, e indica o quanto os resultados estão acima ou abaixo do valor esperado, como define CHASIN *et al.*, 1998. Foi avaliado também o índice z-score (INMETRO, 2003), conforme o procedimento descrito no item 4.3.5, onde o valor para ostra foi 1,54 e para o albacore tuna foi 0,125. O z-score menor que 2 indica que os resultados são satisfatórios. Os resultados para determinar a exatidão do método foram considerados aceitáveis no trabalho realizado.

Uma vez que na técnica de mineralização utiliza-se magnésio, optou-se por realizar um estudo da interferência desse metal nas etapas de pré-redução na determinação do As, usando-se uréia e iodeto de potássio nas concentrações que variaram entre 1000 a 10.000 ppm de magnésio. Este estudo foi também realizado com pré-redução com ácido ascórbico e iodeto

de potássio. A Figura 10 indica que não há discrepância entre os resultados obtidos nas duas metodologias para pré-redução. Entretanto, observa-se que para teores entre 1000 a 2000 ppm de magnésio ocorre um leve aumento na concentração de As, enquanto que nos teores acima de 2000ppm de Mg ocorre uma diminuição de As. É importante notar que, nas diluições feitas nas amostras determinadas pelo método adotado, a concentração de magnésio não é superior a 850 ppm. Assim, considera-se que, nessas condições, o magnésio não interfere na análise de As.

A Tabela 11 apresenta os resultados das amostras analisadas pelos dois métodos, o dietilditiocarbamato de prata e o absorção atômica e pré redução com a uréia, onde os valores obtidos neste último variaram entre 0,6 a 9,54 mg/kg, onde os níveis acima de 1 mg/Kg, superam os recomendados pela legislação brasileira. Resultados variáveis como esse foram também observados por MUÑOZ *et al.*, 2000, na Espanha, onde 66% do pescado estava acima do recomendado pela legislação daquele país. Estes autores observaram teores de 0,3 a 26,22 mg/Kg para arsênio total, em amostras de peixe e produtos de peixe, analisados por absorção atômica pela técnica de geração de hidretos (FI-HG AAS). Como a presença de compostos arseniais em alimentos está também relacionada à atividade antropogênica, esses teores variam de um local para outro.

MANTOVANI *et al.*, 2004, apresentou dados da análise de 24 amostras de peixe "in natura", à partir do método de digestão por via seca com nitrato de magnésio usado por LEBLANC e JACKSON, 1973, e emprego da técnica de quantificação ICP OES na análise de arsênio, onde encontrou índices de contaminação em cerca de 80% das amostra analisadas, com valores que variavam entre 0,32 à 7,18 mg/Kg. Também não foram indicadas as espécies de peixe, apenas denominados de "pescado" e como conclusão foi considerado que a contaminação pelos contaminantes inorgânicos é inerente a cadeia produtiva e depende da procedência e das espécies analisadas.

Por outro lado, MOLLERKE *et al.*, 2003, analisando arsênio total em pescado, piava (*Leporinus obtusidens*) e pintado (*Pimelodus maculatus*) no Rio Grande do Sul, encontrou níveis inferiores a 1 mg/Kg (0,01 a 0,38 mg/Kg), usando a técnica de absorção atômica com geração de hidretos.

MELLO *et al.*, 1999, avaliando os teores de As total em pescados de água doce, observaram teores que variaram de 0,027 a 0,066 mg/Kg, em filés, nas sete espécies analisadas criadas em tanques e alimentadas com ração.

Os dados da Tabela 11 foram dispostos em diagramas de blocos, conforme mostra a Figura 13. A dispersão dos valores de concentração de As total pelas duas técnicas mostra diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos de resultados ($p=0,006$). Há também correlação linear entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($p<0,05$) o que indica uma perda sistemática do analito pelo método DDC-Ag e permite o seu dimensionamento pelo uso da equação da reta. Os resultados obtidos por DDC-Ag são cerca de 40% dos obtidos por HGAAS (Figuras 13 e 14).

Com esses resultados pode-se observar que há uma tendência em interpretar diferentemente os dados de contaminação conforme a técnica escolhida. Contudo a de maior confiabilidade, por sua exatidão, foi a de HGAAS.

Dos valores analisados na Tabela 11, que apresenta os resultados encontrados pela técnica por HGAAS, 89% estão com níveis acima de 1 mg/Kg, que é o limite máximo preconizado pela legislação brasileira para peixes e produtos de peixe (Tabela 1); dos resultados obtidos pela técnica de DDC-Ag, 55,5 % estão acima do limite de 1 mg/Kg.

Vale a pena notar que parte das amostras de cação avaliadas no presente trabalho foi também analisada, por especiação, no laboratório da

Dra Rosa Montoro, em Valência, Espanha, e os resultados mostraram que 90% do As presente encontrava-se na forma de arsenobetaina (comunicação pessoal).

Compostos orgânicos tais como arsenobetaina, arsenocolina, sais de tetrametilarsônio, arsenoaçúcares e arsenolipídeos são encontrados principalmente em frutos do mar, embora o sejam também em espécies de água doce. A arsenobetaina é considerada de baixa toxicidade, contribuindo assim, para minimizar os eventuais efeitos nocivos associados à ingestão de peixes de água salgada contendo teores elevados de As total.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O método do dietilditiocarbamato de prata apresentou uma baixa recuperação e LD e LQ maiores que os do método por HGAAS.
- O método utilizando espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos apresentou linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e exatidão adequados para a sua aplicação na determinação de As total em peixes.
- Os teores de As total em peixes obtidos pelo método do dietilditiocarbamato de prata apresentaram valores de aproximadamente 1/3 dos obtidos por espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos
- Os níveis de As total nos cações analisados por HGAAS, em 89% das amostras ultrapassavam os limites recomendados pela legislação brasileira que é de 1 mg/Kg.

8. RECOMENDAÇÕES

O peixe é um alimento considerado de excelente valor nutricional pelo seu alto teor protéico e pela presença de micro nutrientes de relevância para a saúde humana. Assim, uma vez que tem-se observado um aumento do consumo de peixes nos hábitos alimentares do brasileiro, seria adequado que houvessem maiores e mais amplas informações sobre a qualidade dos pescados disponíveis comercialmente para consumo no Brasil e uma maior fiscalização em relação aos contaminantes presentes, uma vez que 89% das amostras analisadas apresentaram teores superiores aos recomendados.

É necessário que sejam avaliadas as formas dos metais presentes nos peixes para consumo alimentar e seu nível de toxicidade, visto que nossa legislação limita um valor de 1 mg/Kg para o arsênio total. Há a necessidade de um programa de monitorização para avaliar o grau de contaminação desses produtos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- ABOU-ARAB, A.A.K.; AYESH, A.M.; AMRA, H.A.; NAGUIB, K. Characteristic levels of some pesticides and heavy metals in imported fish. *Food Chem.*, Amsterdam, v.57, n.4, p.487-492, 1996.
- ACKLEY, K.L.; B"HYMER, C.; SUTTON, K.L.; CARUSO, J.A. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, Letchworth, v.14, p.845-850, 1999.
- ALESSIO, L.; APOSTOLI, P.; DELLA-ROSA, H.V. Toxicology of metals. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.4, n.1/2, p.1-4, 1991.
- ARBAB-ZAVAR, M.H.; HASHEMI, M. Evaluation of electrochemical hydride generation for spectrophotometric determination of As(III) by silver diethyldithiocarbamate. *Talanta*, Amsterdam, v.52, p.1007-1014, 2000,
- ARSENIC.In:STANDARD methods : for examination of water and wastewater. 19.ed. Washington: American Public Health Associaton, 1995. seção.3.49-3.51.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. *Official methods of analysis of AOAC*. Gaithersburg, 1990. v.1-15.
- BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; ABRÃO, J.J.; GUARDIA, M.L. Especificação de arsênio: uma revisão. *Quim. Nova*, São Paulo, v.23, n.1, p.58-70, 2000.
- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo: EPU, 1981. 350p.

- BLADEREN, P.J.V. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem.-Biol. Interact.*, Amsterdam, v.129, n.1, p.61-76, 2000.
- BOLS, N.C. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, Amsterdam, v.25, p.853-873, 2001.
- BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M.; RIVAS, C.; CARRERO, P. On-line cryogenic trapping with microwave heating for the determination and speciation of arsenic by flow injection/ hydride generation/atomic absorption spectrometry. *Talanta*, Amsterdam, v.45, p.531-542, 1998.
- BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. *Talanta*, Amsterdam, v.44, p.1581-1604, 1997.
- CAMPOS, M.L.A.M.; BENDO, A.; VIEL, F.C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. *Quim. Nova*, São Paulo, v.25, n.5, p.808-813, 2002.
- CARABANTES, A.G. *Contaminação do ambiente com arsênio e seus efeitos na saúde humana: uma revisão*. São Paulo, 2003. 124p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- CARVALHO FILHO, A. *Peixes: costa brasileira*. São Paulo: Melro, 1999. 320p.
- CERDÁ, V.; CERDÁ, A.; CLADERA, A.; OMS, M.T.; MAS, F.; GÓMEZ, E.; BAUZÁ, F.; MIRÓ, M.; FORTEZA, R.; ESTELA, J.M. Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v.20, n.8, p.407-418, 2001.

CETESB.Solo. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo.Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/solo/solo_geral.asp.Acesso em: 18 jan.2005

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; NETO, L.M.R. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHICOUREL,E.L.; TENUTA-FILHO,A.; SAKUMA,A.M., ZENEBON,O.; AMORIN,A .R. Mercúrio em pescado comercializado em São Paulo – SP, Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.15, n.2, p.144-149, 1995.

CHMILENKO, F.A.; BAKLANOV, A.N.; SIDOROVA, L..P.; LEBEDEVA, A.V.; LEBEDEVA, A.V. Ultrasonic intensification of sample preparation for the spectrophotometric determination of arsenic in foodstuffs. *J. Anal. Chem.*, New York, v.56, n.1, p.13-16, 2001.

DEVYATYKH, G.G.G.; CHURBANOV, M.F.; SCRIPACHEV, I.V.; SNOPATIN, G.E.; DIANOV, E.M.; PLOTNICHENKO, V.G. Recent developments in As –S glass fibres. *J. Non-Cryst. Solids*, Amsterdam, v.256-257, p.318-322, 1999.

EKSBORG, S.; EHRSSON, H. Calibration curves: calculation and evaluation of accuracy. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v.16, n.6, p.629-631, 1994.

EURACHEM. Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: Eurachem, 1998. 54p.

- FARRELL, J.R.; ILES, P.J.; YUAN, Y.J. Determination of arsenic by hydride generation gas diffusion flow injection analysis with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.334, p.193-197, 1996.
- FEDOROV, P.N.; RYABCHUK, G.N.; ZVEREV, A.V. Comparison of hydride generation and graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of arsenic in food. *Spectrochim. Acta, Part B*, Amsterdam, v.52, p.1517-1523, 1997.
- FISHER, L.D.; VAN BELLE, G. *Biostatistics: a methodology for the health science*. New York: Wiley-Interscience, 1993. 991p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics).
- GAO, H.W. Dual-wavelength β -correction spectrophotometric determination of arsenic in wastewater with ethyl violet. *Talanta*, Amsterdam, v.42, p.891-895, 1995.
- GEBEL, T. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology*, Amsterdam, v.144, p.155-162, 2000.
- GEORGE, G.M.; FRAHM, L.J.; MCDONNELL, J.P. Dry ashing method for the determination of total arsenic in animal tissues: Collaborative Study. *J. AOAC. Int.*, Gaithersburg, v.56, n.4, p.793-797, 1973.
- GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, Columbus, v.1, p.305-309, 1996.
- GREGUS, Z.; GYURASICS, A. Role of glutathione in the biliary excretion of the arsenical drugs trimelarsan and melarsoprol, Bulgária. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v.59, p.1375-1385, 2000.

GONG, Z.; LU, X.; MA, M.; WATT, C.; LE, X.C. Arsenic speciation analysis. *Talanta*, Amsterdam, v.58, p.77-96, 2002.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: CASARETT, L.J.; KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: MacGraw-Hill, 1996. cap.23, p.691-698.

HERCE-PAGLIAI, C.; MORENO, I.; GONZALEZ, G.; REPETTO, M.; CAMEAN, A.M. Determination of total arsenic, Inorganic and organic arsenic species in wine. *Food Addit. Contam.*, Basingstoke, v.19, n.6, p.542-546, 2002.

HERNANDEZ-ZAVALA, A.; RAZO, L.M.D.; GARCIA-VARGAS, G.G.; AGUILAR, C.; BORJA, V.H.; ALBORES, A.; CEBRIAN, M. Altered activity of heme biosynthesis pathway enzymes in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Arch Toxicol.*, Heidelberg, v.73, p.90-93, 1999.

HERSHEY, J. W.; OOSTDYK, T.S.; KELIHER, P.N. Determination of arsenic and selenium in environmental and agricultural samples by hydride generation atomic absorption spectrometry. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, v.71, n.6, p.1090-1093, 1988.

HOPENHAYN-RICH, C.; BIGGS, M.L.; KALMAN, D.A.; MOORE, L.E.; SMITH, A.H. Arsenic methylation patterns before and after changing from high to lower concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.104, n.11, p.1200-1207, 1996.

HOWARD, A.G.; SALOU, C. Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.333, p.89-96, 1996.

HSUEH, Y.M.; HSU, M.K.; CHIOU, H.Y.; YANG, M.H.; HUANG, C.C.; CHEN, C.J. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.133, p.83-91, 2002.

HUGHES, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.133, p.1-16, 2002.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation analytical procedures: methodology. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 28 jan. 03.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Inorganic arsenic compounds other than arsine health and safety guide. Geneva: WHO, 1992. p.1-16. (Health and safety guide n.70).

IPOLYI, I.; FODOR, P. Development of analytical systems for the simultaneous determination of the speciation of arsenic [As(III), methylarsonic acid, dimethylarsinic acid, As(V)] and selenium [Se(IV), Se(VI)]. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.413, p.13-23, 2000.

INMETRO. Acreditação (Credenciamento). Documentos Necessários para Acreditação (Credenciamento). Laboratórios de Calibração e de Ensaios segundo requisitos da NBR/ISSO/IEC/17025. Documentos Orientativos. *DOQ-CGRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos*.2003. Disponível em : <http://inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>.Acesso em: 01 fev de2005.

JAIN, C.K.; ALI, I. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Res.*, Amsterdam, v.34, n.17, p.4304-4312, 2000.

- KAISE, T. Biotransformation of arsenobetaine to trimethylarsine oxide by marine microorganisms in a gill of clam *meretrix lusoria*. *Chemosphere*, Amsterdam, v.37, n.3, p.443-449, 1998.
- KIM, M.J.; NRIAGU, J.; HAACK, S. Carbonate ions and arsenic dissolution by groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, Columbus, v.34, p.3094-3100, 2000.
- KINNIBURGH, D.G.; KOSMUS, W. Arsenic contamination in groundwater: some analytical considerations. *Talanta*, Amsterdam, v.58, p.165-180, 2002.
- KUBOTA, R.; KUNITO, T.; TANABE, S. Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environ. Pollut.*, Amsterdam, v.115, p.303-312, 2001.
- KUBOTA, T.; YAMAGUCHI, T.; OKUTANI, T. Determination of arsenic content in natural water by graphite furnace atomic absorption spectrometry after collection as molybdoarsenate on activated carbon. *Talanta*, Amsterdam, v.46, p.1311-1319, 1998.
- LE, X.C.; MA, M.; WONG, N.A. Speciation of arsenic compoud using high-perfomance liquid chromatography at elevated temperature and selective hydride generation atomic fluorescence detection. *Anal. Chem.*, Columbus, v.68, p.4501-4506, 1996.
- LEBLANC, P.J.; JACKSON, A. Dry ashing technique for the determination of arsenic in marine fish. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, v.56, n.2, p.383-386, 1973.

- LI, W.; WEI, C.; ZHANG, C.; HULLE, M.V.; CORNELIS, R.; ZHANG, X. A survey of arsenic species in chinese seafood. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.41, p.1103-1110, 2003.
- LIBERTI, L.; POLEMIO, M. Arsenical accidental soil contamination near manfredonia, a case history. *J. Environ. Sci., Health, Part A: Environ. Sci. Eng.*, Monticello, v.A16, n.3, p.297-314, 1981.
- LINGE, K.L.; OLDHAM, C.E. Interference from arsenate when determining phosphate by the malachite green spectrophotometric method. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.450, p.247-252, 2001.
- LIU, J.; LIU, Y.P.; HABEEBU, S.M.; WAALKES, M.P.; KLAASSEN, C.D. Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice. *Toxicology*, Amsterdam, v.147, n.3, p.157-166, 2000.
- LOFFREDO, C.A.; APOSHIAN, H.V.; CEBRIAN, M.E.; YAMAUCHI, H.; SILBERGELD, E.K. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ. Res.*, New York, v.92, p.85-91, 2003.
- LU, H.; MOU, S.; RIVIELLO, J.M. Use of ion chromatography for the determination of heavy and transition metals in biochemical samples. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.857, p.343-349, 1999.
- LUNDE, G. Analysis of arsenic and selenium in marine raw materials. *J. Sci. Food Agric.*, Bognor Regis, v.21, p.242-247, 1970.
- MA, M.; LE, X.C. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clin. Chem.*, Washington, v.44, n.3, p.539-550, 1998.

- MAHER, W.A. A decomposition procedure for the determination of arsenic in marine samples. *Talanta*, Amsterdam, v.30, n.7, p.534-536, 1983.
- MANDAL, B.K.; SUZUKI, K.T. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, Amsterdam, v.58, p.201-235, 2002.
- MANTOVANI, D.M.; ANGELUCCI, E. Avaliação do teor de arsênio em atum e sardinha. *Bol. Inf. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.*, Campinas, v.26, n.1, p.1-5, 1992.
- MANTOVANI, D.M.B.; MORGANO, M.A.; BAÚ, C.P.; PEREZ, A.A.; NEIVA, C.R.P.; LEMOS NETO, M.J.; SILVEIRA, N.F.A. Estudo de contaminantes inorgânicos da cadeia produtiva do pescado marinho na Baixada Santista – SP. Em: ENCONTRO NACIONAL SOBRE CONTAMINANTES INORGÂNICOS, 9, São Paulo, 2004. *Resumos*. São Paulo: IPEN, 2004.p.53.
- MCKIERNAN, J.W.; CREED, J.T.; BROCKHOFF, C.A.; CARUSO, J.A.; LORENZANA, R.M. A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish. *J. Anal. At. Spectrom.*, Letchworth, v.14, p.607-613, 1999.
- MEHTA, A.; FLORA, S.J.S. Possible role of metal redistribution, hepatotoxicity and oxidative stress in chelating agents induced hepatic and renal metallothionein in rats. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.39, p.1029-1038, 2001.
- MELO, L.F.C.; MORGANO, M.A.; MANTOVANNI, D.M.B. Avaliação do teor de arsênio total em pescado de água doce. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.58, n.2, p.81-86, 1999.

MERRY, R.H.; ZARCINAS, B.A. Spectrophotometric determination of arsenic and antimony by the silver diethyldithiocarbamate method. *Analyst*, Letchworth, v.105, p.558-563, 1980.

MOLLERKE, R.O.; NOLL, I.B.; SANTO, M.A.B.E.; NORTE, D.M. Níveis de arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do Lago Guaíba em Porto Alegre RS-Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.62, n.2, p.117-121, 2003.

MIDIO, A.F.; TOMOTAKE, M.V.H. Arsenic concentration in two species of crabs collected in the region of Cubatão, São Paulo, Brazil. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.24., n.2, p.128-135, 1998.

MILLER, W.H.; SCHIPPER, H.M.; LEE, J.S.; SINGER, J.; WAXMAN, S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.*, Birmingham, v.62., p.3893-3903, 2002.

MOISEENKO, T.I.; KUDRYAVTSEVA, L.P. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. *Environ. Pollut.*, Amsterdam, v.114, p.285-297, 2001.

MOLL, A.E.; HEIMBURGUER, R.; LAGUARDE, F.; LEROY, M.J.F.; MAIER, E. Arsenic speciation in marine organisms: from the analytical methodology to the constitution of reference materials. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, Berlin, v.354, p.550-556, 1996.

MORALES-AIZPURÚA, I.C.; TENUTA-FILHO, A.; SAKUMA, A.M., ZENEBON, O. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo – SP, Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.19, n.3, p.429-432, 1999.

- MOREIRA, J.C. Threats by heavy metals: human and environmental contamination in Brazil. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.188, n.1, p.S61-S71, 1996.
- MUÑOZ, O.; DEVESA, V.; SUNER, M.A.; VELEZ, D.; MONTORO, R.; URIETA, I.; MACHO, M.L.; JALON, M. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.48, p.4369-4376, 2000.
- MUÑOZ, O.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R. Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + As (V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*, Letchworth, v.124, p.601-607, 1999.
- NATH, R.; DINENDER, K.; LI, T.; SINGAL, P.K. Metallothioneins. Oxidative stress and the cardiovascular system. *Toxicology*, Amsterdam, v.155, p.17-26, 2000.
- OCHSENKUHN-PETROPULU, M.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching / digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.337, p.323-327, 1997.
- PANTSAR-KALLIO, M.; KORPELA, A. Analysis of gaseous arsenic species and stability studies of arsine and trimethylarsine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.410, p.65-70, 2000.
- PARK, J.D.; LIU, Y.; KLAASSEN, C.D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*, Amsterdam, v.163, p.93-100, 2001.

PERKIN ELMER. Running samples with fias.In: _ _ _ _ . Manual do equipamento Analist 100.Local:PERKIN ELMER, s.d. seção 13.22.

PILLAI, A.; SUNITA, G.; GUPTA, V.K A new system for the spectrophotometric determination of arsenic in environmetal and biological samples. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.408, p.111-115, 2000.

RAHMAN, L.; CORNS, W.T.; BRYCE, D.W.; STOCKWELL, P.B. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimoy in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, Amsterdam, v.52, p.833-843, 2000.

RAYMENT, G.E.; BARRY, G.A. Indicador tissues for heavy metal monitoring: additional attributes. *Mar. Pollut. Bull.*, Amsterdam, v.41, n.7/12, p.353-358, 2000.

RAZO, L.M.D.; QUINTANILLA-VEGA, B.; BRAMBILA-COLOMBRES, E.; CALDERÓN-ARANDA, E.S.; MANNO, M.; ALBORES, A. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.177, p.132-148, 2001.

SAARELA, K.E.; LILL, J.O.; HERNBERG, F.J.; HARJU, L.; LINDROOS, A.; HESELIUS, S.J. Preconcentration of trace elements in biological materials by dry ashing for TPIXE analysis a study of matrix effects. *Nucl. Instrum. Methods Phys., Res., Sect. B*, Amsterdam, v.103, p.466-472, 1995.

SAHUQUILLO, A.; RAURET, G.; REHNERT, A.; MUNTAU, H. Solid sample graphite furnace atomic absorption spectroscopy for supporting arsenic determination in sediments following a sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.476, p.15-24, 2003.

- SAKUMA, A .M. Avaliação da exposição humana ao arsênio no alto Vale do Ribeira, Brasil. Campinas, 2004. 196p. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas.
- SLEJKOVEC, Z.; ELTEREN, J.T.V.; BYRNE, A.R. A dual arsenic speciation system combining liquid chromatographic and purge and trap-gas chromatographic separation with atomic fluorescence spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.358, n.1, p.51-60, 1998.
- SMITH, A.H.; LINGAS, E.O.; RAHMAN, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. W. H. O.*, Geneva, v.78, n.9, p.1093-1103, 2000.
- SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V. Reações de ortometalação em piridinas. *Quim. Nova*, São Paulo, v.25, n.1, p.89-98, 2002.
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.*, Orlando, v.18, n.2, p.321-336, 1995.
- STOLZ, J.F.; OREMLAND, R.S. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol. Rev.*, Amsterdam, v.23, p.615-627, 1999.
- SUNER, M.A.; DEVESA, V.; MUNOZ, O.; LOPEZ, F.; MONTORO, R.; ARIAS, A.M.; BLASCO, J. Total and inorganic arsenic in the fauna of the Guadalquivir estuary : environmental and human health implications. *FEMS Microbiol. Rev.*, Amsterdam, v.23, p.615-627, 1999.
- TRIPATHI, R.M.; RAGHUNATH, R.; KRISHNAMOORTHY, T.M. Arsenic intake by the adult population in Bombay City. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.208, p.89-95, 1997.

- TU, C.; MA, L.Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator Ldder Brake. *J. Environ. Qual.*, Madison, v.31, p.641-647, 2002.
- TUROCZY, N.J.; MITCHELL, B.D.; LEVINGS, A.H.; RAJENDRAM, V.S. Cadmium, copper, mercury, and zinc concentrations in tissues of the King Crab (*Pseudocarcinus gigas*) from southeast Australian waters. *Environ. Int.*, Amsterdam, v.27, p.327-334, 2001.
- UTHUS, E.O. Estimation of safe and adequate daily intake for arsenic. In: MERTZ, W.; ABERNATHY, C.O.; OLIN, S.S., eds. *Risk assessment of essential elements*. Washintong: ILSI Press, 1994. p.273-282.
- VAHTER, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, Amsterdam, v.181-182, p.211-217, 2002.
- VASSILEVA, E.; DOCEKALOVÁ, H.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, S.; HOENIG, M. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determinations in environmental samples. *Talanta*, Amsterdam, v.54, p.187-196, 2001.
- VERNHET, L.; ALLAIN, N.; PAYEN, L.; ANGER, J.; GUILLOUZO, A.; FARDEL, O. Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1- overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v.61, p.1387-1391, 2001.
- VILLA-LOJO, M.C.; ALONSO-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRIGUEZ, D. Coupled high performance liquid chromatography – microwave digestion – hydride generation – a tomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue. *Talanta*, Amsterdam, v.57, p.741-750, 2002.

VIRARAGHAVAN, T.; SUBRAMANIAN, K.S.; ARULDOSS, J.A. Arsenic in drinking water: problems and solutions. *Water Sci. Tech.*, Colchester, v.40, n.2, p.69-76, 1999.

VOET, H.V.D.; RHIJN, J.A.H.V.; WIEL, H.J.V. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.391, p.159-171, 1999.

VOIGT, D.E.; BRANTLEY, S.L. Chemical fixation of arsenic in contaminated soils. *Appl. Geochem.*, Amsterdam, v.11, p.633-643, 1996.

WESTERLUND, S.; AAS, E.; ANDERSEN, O.K. The use of bile in fish in a screening method for trace metal exposure. *Mar. Environ. Res.*, Amsterdam, v.46, n.1/5, p.601-604, 1998.

WILDFANG, E.; HEALY, S.M.; APOSHIAN, H.V. Arsenic. In: ZALUPS, R.K.; KOROPATNICK, J. *Molecular biology and toxicology of metals*. London: Taylor & Francis, 2000. cap.3, p.75-112.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Arsenic*. Geneva: WHO, 1981. 174p. (Environmental Health Criteria, 18) (Task Group on Environmental Health Criteria for Arsenic, 1980, Stockholm).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Arsenic*. Geneva: WHO, 2001. 521p. (Environmental Health Criteria, 18) (Task Group on Environmental Health Criteria for Arsenic, 2001, Stockholm).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arsenic in drinking water. Disponível em: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html>. Acesso em: 31 Jan. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Researchers warn of impending disaster from mass arsenic poisoning. Disponível em: <http://www.who.int/inf-pr-2000/em/pr-2000-55.html>. Acesso em: 31 Jan. 2003.

YABIKU, H.Y.; DIAS, N.A.; MARTINS, M.S. Estudo comparativo de métodos usuais para determinação de arsênio. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.49, n.1, p.51-55, 1989.

YAMAMOTO, M.; YASUDA, M.; YAMAMOTO, Y. Hydride-generation atomic absorption spectrometry coupled with flow injection analysis. *Anal. Chem.*, Columbus, v.57, p.1382-1385, 1985.

YU, D. A physiologically based pharmacokinetic model of inorganic arsenic. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Orlando, v.29, p.128-141, 1999.

ZANINI, A.C.; BASILE, A.C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. *Guia de medicamentos (GUIAMED 97/98)*. São Paulo: IPEX, 1997. 1179p.

ZANINI, A.C.; OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. 515p.