

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

**SIMPLIFICAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO  
DE ARSÊNIO E ENXOFRE POR TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

**CHARLES SOARES HÜBER**

Porto Alegre, junho de 2016.

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

**CHARLES SOARES HÜBER**

**SIMPLIFICAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO  
DE ARSÊNIO E ENXOFRE POR TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

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


Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale  
Orientadora

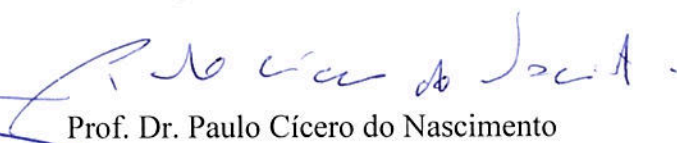
Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy  
Coorientadora

Porto Alegre, junho de 2016.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre junho de 2012 e maio de 2016, no Instituto de Química da Universidade do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Maria Goreti Rodrigues Vale e coorientação da Professora Doutora Morgana Bazzan Dessuy. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**


  
Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda


  
Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

  
Profa. Dra. Márcia Messias da Silva

  
Profa. Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnick

  
Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale  
Orientadora

  
Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy  
Coorientadora

  
Charles Soares Hüber  
Doutorando

*“Imaginar é mais importante que saber, pois o conhecimento é limitado enquanto a imaginação abraça o universo.”*

*Albert Einstein*

*A minha mãe Maria Elena e meu  
pai Ivan, por todo amor e incentivo,*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, Maria Elena e Ivan, e a minha irmã, Rose, pelo amor e apoio incondicional durante toda minha vida.

Ao Tito Lívio e Antonino Pio pelo companheirismo e amor incondicional.

Ao Dr. Deivid Gaia pelo companheirismo.

À professora Dra. Maria Goreti R. Vale pela orientação, palavras de incentivo, amizade e confiança.

À professora Dra. Morgana Bazzan Dessuy pela coorientação, ensinamentos, sugestões, amizade e apoio em todas as etapas dos trabalhos desenvolvidos.

Ao professor Dr. Jiří Dědina do Instituto de Química Analítica da Academia de Ciências Tcheca, pela acolhida e ensinamentos durante o estágio doutoral.

Ao professor Dr. Bernhard Welz por todas as contribuições durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Márcia Messias pela amizade e colaboração durante os anos junto ao Grupo de Análise de Traços da UFRGS.

Ao PPGQ – UFRGS pela oportunidade e apoio recebido, bem como, ao seu corpo docente pelos ensinamentos.

Ao Dr. Milan Svoboda pelo auxílio e ensinamentos durante o período do estágio doutoral.

Aos demais pesquisadores e colegas do laboratório da Academia de Ciências Tcheca, Dr. Jan Kratzer, Dr. Stanislav Musil, Me. Karel Marschner e Dr. Tomáš Matoušek pela colaboração científica e agradável convivência.

Ao Wiliam Boschetti pelo coleguismo e amizade.

Aos queridos colegas do Grupo de Análise de Traços da UFRGS, Ariane, Alex, Álvaro, Aline, Luciane, Débora, Tatiane, Eliana, Josiane, Lucas, Flávio, Raimundo, Antônio, Marianna, Grabiele, Leandro e Mariana pela agradável convivência.

Ao IFSul pelo afastamento para cursar o doutorado.

À CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado no país.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado sanduíche (Proc. 203508/2014-9), Projeto Pesquisador Visitante Especial – PVE (Proc. 400575/2013-2) e Projeto Universal (Proc. 474699/2013-7).

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

Muitíssimo obrigado.

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA POR ESTE TRABALHO**

### **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

1. Huber, C.S.; Welz, B.; Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.; Ferreira, L.O.; Investigação de modificadores químicos para determinação de enxofre em óleo diesel por HR-CS GF MAS; **17° Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, Brasil, 2013. (Poster)**
2. Huber, C.S.; Welz, B.; Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.; Investigation of Chemical Modifiers for Sulfur Determination in Diesel Fuel using HR-CS GF MAS; **European Symposium on Atomic Spectrometry, Prague, Czech Republic, 2014. (Poster)**
3. Huber, C.S.; Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.; Welz, B.; Sulfur determination in diesel fuel via CS molecule using HR-CS GF MAS; **13<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Merida, Yucatan, México, 2014. (Apresentação oral)**
4. Huber, C.S.; Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.; Welz, B.; Determination of sulfur in diesel fuel by HR-CS GF MAS of the carbon monosulfide molecule using Pd/Mg and Ir as chemical modifiers; **Colloquium Analytical Atomic Spectroscopy, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Alemanha, 2015. (Apresentação Oral)**
5. Huber, C.S.; Vale, M.G.R.; Dessuy, M.B.; Svoboda, M.; Dědina, J.; Arsenic Speciation in Baby Food by HG-CT-AAS; **Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX, Figueira da Foz, Portugal, 2015. (Poster)**
6. Huber, C.S.; Vale, M.G.R.; Dessuy, M.B.; Svoboda, M.; Dědina, J.; Slurry sampling hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry for arsenic speciation analysis in baby food; **European Symposium on Atomic Spectrometry, Eger, Hungary, 2016. (Poster)**

## **ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

1. Huber, C.S.; Vale, M.G.R.; Welz, B.; Andrade, J.B.; Dessuy, M.B.; Investigation of chemical modifiers for sulfur determination in diesel fuel samples by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using direct analysis; *Spectrochim. Acta Part B* **2015**, *108*, 68.

## **DEMAIS TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO**

1. de Jesus, A.; Dessuy, M.B.; Huber, C.S.; Zmozinski, A.; Duarte, A.T.; Vale, M.G.R.; Andrade, J.B.; Determination of antimony in pet containers by direct analysis of solid samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry and leaching studies; *Microchem. J.* **2016**, *124*, 222.



# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR .....	4
2.1.1. Arsênio e suas espécies químicas em alimentos.....	4
2.1.2. Análise de especiação química de arsênio em alimentos infantis .....	11
2.1.3. Espectrometria de Absorção atômica com geração de hidretos .....	16
2.1.4. Geração de hidretos aplicada à análise de especiação de As.....	23
2.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA.....	29
2.2.1. Petróleo e óleo diesel .....	29
2.2.2. Enxofre no óleo diesel e a problemática ambiental .....	30
2.2.3. Equipamentos e técnicas analíticas utilizadas para determinação de enxofre.....	31
3. OBJETIVO GERAL .....	40
3.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS ATOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR .....	40
3.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA.....	41
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	42
4.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR .....	42
4.1.1. Instrumentação .....	42
4.1.2. Limpeza do material .....	44
4.1.3. Reagentes e soluções .....	45
4.1.4. Outros materiais .....	46
4.1.5. Sistema de HG-CT-AAS automatizado .....	46
4.1.6. Amostras e material de referência certificado .....	53
4.1.7. Preparo de Amostra .....	55
4.1.8. Procedimento para a análise de especiação de arsênio em alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador .....	58
4.1.9. Determinação de arsênio total por ICP-MS .....	61

4.1.10. Parâmetros de mérito.....	62
4.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA.....	63
4.2.1. Instrumentação .....	63
4.2.2. Reagentes e soluções .....	65
4.2.3. Amostras de óleo diesel e material de referência certificado .....	65
4.2.4. Diluição das amostras.....	66
4.2.5. Procedimento para determinação indireta de enxofre em óleo diesel por HR-CS GF MAS com amostragem direta.....	66
4.2.6. Parâmetros de mérito.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
5.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR .....	70
5.1.1. Otimização e desempenho do sistema de HG-CT-AAS automatizado.....	70
5.1.2. Preparo da amostra na forma de suspensão.....	72
5.1.3. Curvas de calibração e parâmetros de mérito.....	76
5.1.4. Análise das amostras de fórmulas infantis .....	82
5.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA.....	86
5.2.1. Escolha da molécula alvo e comprimento de onda .....	86
5.2.2. Estudos preliminares .....	86
5.2.3. Estudo de modificadores químicos.....	87
5.2.4. Curvas de pirólise e vaporização .....	90
5.2.5. Investigações com o material de referência certificado .....	93
5.2.6. Escolha do padrão de enxofre .....	97
5.2.7. Parâmetros de mérito.....	99
5.2.8. Verificação da exatidão do método .....	100
5.2.9. Análise das amostras de óleo diesel .....	101
5.2.10. Observações sobre a rotina analítica .....	102
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS .....	106

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies de arsênio mais comuns encontradas em alimentos de origem agrícola ..... 5
- Figura 2.** Energia requerida, de acordo com a idade, (■) proveniente do leite materno e de (■) fontes complementares ..... 10
- Figura 3.** Esquema do multiatomizador de quartzo utilizado para a análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado ..... 21
- Figura 4.** Foto do separador gás-líquido, construído com um frasco de polietileno modificado, usado na análise de especiação de As por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador..... 48
- Figura 5.** (a) tubo em forma de “U” de quartzo conforme era recebido do fornecedor; e (b) tubo em forma de “U” após o recobrimento do mesmo com uma resistência metálica (15 Ω) e colocação da rolha de cortiça para isolamento..... 50
- Figura 6.** Foto do arranjo do sistema de aprisionamento criogênico para especiação de As por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador ..... 51
- Figura 7.** Foto do sistema de aprisionamento criogênico completo, para a especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador. .... 52
- Figura 8.** Foto do sistema utilizado para homogeneizar as amostras de alimentos infantis do tipo papinha. .... 57
- Figura 9.** Esquema do sistema utilizado para a especiação de arsênio em alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador ..... 59
- Figura 10.** Cromatograma obtido a partir da medida de 500 µL de uma solução padrão contendo 2 µg L<sup>-1</sup> de iAs, MMAs, DMAs e TMAOs com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl ..... 71
- Figura 11.** Cromatogramas obtidos a partir das medidas de 500 µL de uma solução padrão (a) contendo 2 µg L<sup>-1</sup> de iAs, MMAs e DMAs, com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl e (b) contendo 2 µg L<sup>-1</sup> de TMAOs, sem L-cisteína-HCl ..... 71
- Figura 12.** Absorvância integrada para (a) iAs e (b) DMAs com o uso de diferentes reagentes e concentrações em solução aquosa no preparo da amostra MC1 na forma de suspensão ..... 74
- Figura 13.** Cromatogramas obtidos com o emprego de (■) TMAH 2 mol L<sup>-1</sup>, (■) HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e (■) HCl 3 mol L<sup>-1</sup> no preparo da suspensão da amostra MC1 ..... 75
- Figura 14.** Absorvâncias integradas para 10 µL de óleo diesel S500 usando 400 µg de cada modificador permanente (Ir, Zr e Ru) e 40 µg de Pd (□), 20 µg de Mg (■), 40/20 µg de Pd/Mg (■) e 40 µg de Ca (■)..... 88
- Figura 15.** Efeito da massa do modificador químico de Pd/Mg na absorvância integrada das medidas de 20 µL dos padrões (500 ng de S) e 10 µL da amostra de óleo diesel S500, com a utilização de 400 µg de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína..... 90

- Figura 16.** Curvas de pirólise para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu$ L da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína. .... 91
- Figura 17.** Perfis de absorvância obtidos no CP para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu$ L da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente ..... 92
- Figura 18.** Curvas de vaporização para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu$ L da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína ..... 93
- Figura 19.** Efeito da massa do modificador químico de Pd/Mg na absorvância integrada das medidas de 5  $\mu$ L do material de referência certificado SRM NIST 2724b, com a utilização de 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente ..... 94
- Figura 20.** Absorvâncias integradas obtidas na análise de 5  $\mu$ L do material de referência certificado de enxofre em óleo diesel NIST 2724b em tubos de grafite com e sem plataforma integrada, com a utilização 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente e 120/60  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução ..... 95
- Figura 21.** Curvas de pirólise (■) e vaporização (▲) para molécula de CS a partir de 10  $\mu$ L de uma solução 0,125 kg L<sup>-1</sup> de óleo diesel S500 em 1-propanol, com a utilização 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente e 120/60  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução ..... 96
- Figura 22.** Perfis de absorvância resolvidos no tempo para molécula de CS no comprimento de onda de 258,056 nm para a (■) L-cisteína, (■) ácido sulfâmico, (■) CRM SRM 2724b, (■) diesel S500 e (■) diesel S10, com a utilização 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente e 120/60  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução ..... 98
- Figura 23.** Espectro de absorção molecular, resolvido temporalmente, da molécula de CS, obtido da (a) solução padrão aquosa de L-cisteína (500 ng S) e de (b) 10  $\mu$ L de uma solução 0,125 kg L<sup>-1</sup> de óleo diesel S500 em 1-propanol. Medidas realizadas em tubo de grafite PIN com 400  $\mu$ g de Ir e 120/60  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente..... 99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Valores experimentais da LD <sub>50</sub> para diferentes formas de arsênio .....	5
<b>Tabela II.</b> Concentração de arsênio total em diferentes grupos de alimentos do Canadá .....	7
<b>Tabela III.</b> Parâmetros instrumentais utilizados na determinação total de arsênio nas amostras de alimentos infantis por ICP-MS.....	44
<b>Tabela IV.</b> Informações e composição majoritária das amostras utilizadas na análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado.....	54
<b>Tabela V.</b> Programa com os parâmetros utilizados para a digestão ácida assistida por micro-ondas para a determinação total de arsênio por ICP-MS.....	58
<b>Tabela VI.</b> Compostos de arsênio e pontos de ebulição de suas respectivas arsinas. ...	58
<b>Tabela VII.</b> Programa utilizado para a análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado.....	60
<b>Tabela VIII.</b> Programa de aquecimento utilizado na determinação de S, via molécula de CS, por HR-CS GF MAS em tubo com plataforma integrada (PIN). .....	64
<b>Tabela IX.</b> Programa de aquecimento utilizado na determinação de S, via molécula de CS, por HR-CS GF MAS em tubo sem plataforma integrada.....	64
<b>Tabela X.</b> Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento dos fornos de grafite, na determinação de enxofre por HR-CS GF MAS.....	67
<b>Tabela XI.</b> Sensibilidades relativas, considerando a A <sub>int</sub> do iAs sendo 100%, para as espécies iAs, MMAs e DMAs em uma solução padrão aquosa com 2 µg L <sup>-1</sup> de cada uma dessas espécies (com L-cisteína-HCl 2% m/v), e TMA <sub>5</sub> O em uma solução padrão aquosa com 2 µg L <sup>-1</sup> dessa espécie (sem a adição de L-cisteína-HCl), por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador .....	72
<b>Tabela XII.</b> Parâmetros de mérito para análise de especiação química de As em amostras de alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e calibração com soluções padrão aquosas com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl .....	77
<b>Tabela XIII.</b> Coeficientes angulares e lineares para as espécies iAs e DMAs obtidos a partir de amostras fortificadas antes e depois do preparo da suspensão e soluções padrão aquosas, por HG-CT-AAS automatizado .....	79
<b>Tabela XIV.</b> Resultados analíticos obtidos por HG-CT-AAS automatizado na especiação de As no CRM ERM-BC211 na forma de suspensão .....	80
<b>Tabela XV.</b> Limites de detecção e quantificação do método obtido para determinação de tAs em amostras de alimentos infantis por ICP-MS após digestão ácida assistida por forno de micro-ondas .....	81
<b>Tabela XVI.</b> Concentrações de tAs encontradas nos materiais de referência certificados ERM-BC211 e NIST 1568a por ICP-MS após digestão ácida assistida por micro-ondas .....	82

<b>Tabela XVII.</b> Resultados analíticos obtidos por HG-CT-AAS automatizado com multiatomizador para as espécies de As em amostras de alimentos infantis na forma de suspensão.....	83
<b>Tabela XVIII.</b> Parâmetros de mérito obtidos com a solução de L-cisteína para calibração na determinação de S, como CS, por HR-CS GF MAS usando 400 µg de Ir e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente, como modificadores químicos .....	99
<b>Tabela XIX.</b> Resultado obtido para determinação de enxofre no CRM SRM 2724b diluído em 1-propanol (0,125 kg L <sup>-1</sup> ), por HR-CS GF MAS com calibração feita com solução padrão aquosa de L-cisteína em tubo de grafite PIN com 400 µg de Ir e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente .....	101
<b>Tabela XX.</b> Determinação de enxofre em amostras de óleo diesel diluídas em 1-propanol em tubo de grafite PIN usando 400 µg de Ir e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente, como modificadores químicos, por HR-CS GF MAS e valores de referência para amostras de óleo diesel S10 determinados pelo método ASTM D 5453:2012 .....	101

## LISTA DE ABREVIACÕES

AAS - Espectrometria de absorção atômica (do inglês “*Atomic Absorption Spectrometry*”)

AEC - Cromatografia de troca iônica (ânions) (do inglês “*Anion Exchange Chromatography*”)

ANP - Agência Nacional do Petróleo

ASTM - Sociedade Americana de Testagem e Materiais (do inglês “*American Society for Testing and Materials*”)

CCD - Dispositivo de carga acoplada (do inglês “*Coupled Charge Dispositive*”)

CRM - Material de referência certificado (do inglês “*Certified Reference Material*”)

CT - Aprisionamento criogênico (do inglês “*Cryotrapping*”)

DMAs - espécie dimetilada de arsênio

EDL - Lâmpada de descarga sem eletrodos (do inglês “*Electrodeless Discharge Lamp*”)

ED-XRF - Fluorescência de raios-X com energia dispersiva (do inglês “*Energy Dispersive X-ray Fluorescence*”)

EFSA - Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (do inglês “*European Food Safety Authority*”)

EPA - Agência de Proteção Ambiental (do inglês “*Environmental Protection Agency*”)

ERM - Material de referência europeu (do inglês “*European Reference Material*”)

ET AAS – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês “*Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*”)

EU - União Europeia (do inglês “*European Union*”)

F AAS - Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês “*Flame Atomic Absorption Spectrometry*”)

GF - Forno de grafite (do inglês “*Graphite Furnace*”)

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*”)

HCL - Lâmpada de Cátodo Oco (do inglês “*Hollow Cathode Lamp*”)

HG - Geração de hidretos (do inglês “*Hydride Generation*”)

HG AAS - Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (“*Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*”)

HG-CT-AAS - Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e aprisionamento criogênico (do inglês “*Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry*”)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)

HPLC-ICP-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”)

HR-CS F MAS - Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e chama (do inglês “*High Resolution Continuum Source Flame Molecular Absorption Spectrometry*”)

HR-CS GF MAS - Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (do inglês “*High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry*”)

HR-CS MAS - Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (do inglês “*High Resolution Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry*”)

HR-CS SS-GF MAS - Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite com análise direta de sólidos (do inglês “*High Resolution Continuum Source Solid Sampling Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry*”)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês “*International Agency for Research on Cancer*”)

iAs - arsênio inorgânico total

IC - Cromatografia iônica (do inglês “*Ion Chromatography*”)

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”)



ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”)

LC - Cromatografia líquida (do inglês “*Liquid Chromatography*”)

LD<sub>50</sub> - Dose letal mediana (do inglês “*Lethal Dose, 50%*”)

LOD - Limite de detecção (do inglês “*Limit of Detection*”)

LOQ - Limite de quantificação (do inglês “*Limit of Quantification*”)

LS AAS - Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês “*Line Source Atomic Absorption Spectrometry*”)

LS GF MAS - Espectrometria de absorção molecular com fonte de linha e forno de grafite (do inglês “*Line Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry*”)

LS MAS - Espectrometria de absorção molecular com fonte de linha (do inglês “*Line Source Molecular Absorption Spectrometry*”)

m<sub>0</sub> - Massa característica

MMA<sub>s</sub> - espécie monometilada de arsênio

MP<sub>10</sub> - Material particulado com diâmetro <10 µm

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês “*National Institute of Standards and Technology*”)

PMTDI – Ingestão diária máxima tolerável provisória (do inglês “*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*”)

PROCONVE - Programa de Controle de Poluição do Ar Por Veículos Automotores

QTA - Atomizador de tubo de quartzo (“*Quartz Tube Atomizer*”)

SF-ICP-MS - Espectrometria de massas com setor magnético e plasma acoplado indutivamente (do inglês “*Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”)

tAs - arsênio total

TeMA - íon tetrametilarsônico

tep - tonelada equivalente de petróleo

TMAH - hidróxido de tetrametil amônio (do inglês “*tetramethylammonium hydroxide*”)

TMA<sub>3</sub>O - óxido de trimetilarsênio

UK FSA - Autoridade de Segurança Alimentar do Reino Unido (do inglês “*United Kingdom Food Safety Authority*”)

ULSD - Óleo diesel com concentração ultrabaixa de enxofre (do inglês “*Ultra Low Sulfur Diesel*”)

UVIF - Fluorescência induzida por ultravioleta (do inglês “*Ultraviolet Induced Fluorescence*”)

WD-XRF - Fluorescência de raios-X com comprimento de onda dispersivo (do inglês “*Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*”)

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês “*World Health Organization*”)

XRF - Fluorescência de raios-X (do inglês “*X-ray Fluorescence*”)

## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para a análise de especiação de arsênio em alimentos infantis, por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e aprisionamento criogênico (HG-CT-AAS), e determinação de enxofre em óleo diesel, por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF MAS), via molécula de CS. Para ambos os métodos foi possível a redução dos procedimentos inerentes ao preparo das amostras. Na análise de especiação de As, a amostra foi preparada na forma de suspensão com o emprego de reagentes mais brandos o que preservou a composição original, isto é, a integridade das espécies de As. As concentrações da espécie mais tóxica de As, ou seja, o As inorgânico, encontradas nos alimentos infantis ficaram abaixo dos limites estabelecidos pelas legislações brasileira, europeia e chinesa. No que tange a determinação de enxofre em óleo diesel, a análise direta da amostra após a diluição com 1-propanol, minimizou o número de etapas operacionais que seriam empregadas se um método de preparo de amostra como a emulsão/micro-emulsão, fosse utilizado. Além do mais, foi mandatório uma investigação criteriosa do uso de modificadores químicos para a estabilização térmica do enxofre. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego de uma massa de 120  $\mu\text{g}$  de Pd e 60  $\mu\text{g}$  de Mg, como modificador em solução, combinado ao uso de 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente. As amostras de óleo diesel analisadas estavam em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

## ABSTRACT

In this work analytical methods were developed for arsenic speciation analysis in baby food using hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry (HG-CT-AAS), and the determination of sulfur in diesel fuel by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS) via the CS molecule. For both methods it was possible to reduce the procedures related to sample preparation. In As speciation analysis, the sample was prepared as a slurry with the use of mild reagents which preserved the original arsenicals composition, i.e., the integrity of the As species. The concentration of the most toxic As specie (inorganic As) found in baby food were below the limits set by Brazilian, European and Chinese laws. Regarding the determination of sulfur in diesel, the direct analysis of the sample after dilution with propan-1-ol, minimized the number of operational steps that would be necessary if a sample preparation as emulsion/microemulsion would have been used. Furthermore, a careful investigation was mandatory the use of chemical modifiers for thermal stabilization of sulfur. The best results were obtained with the use of 120  $\mu\text{g}$  Pd and 60  $\mu\text{g}$  Mg, as modifier in solution, combined with the use of 400  $\mu\text{g}$  Ir as permanent modifier. The S concentration in the analyzed diesel fuel samples was in accordance with the limits set by Brazilian law.

## 1. INTRODUÇÃO

O preparo de amostra é uma etapa considerada crítica em um procedimento analítico e mesmo com todo o avanço observado recentemente, esse procedimento continua necessitando de mais atenção e esforços para o seu desenvolvimento. As evoluções nesse campo da química analítica ao longo das últimas décadas, foram impulsionadas, principalmente, pelo aperfeiçoamento e maior acesso aos procedimentos assistidos por micro-ondas. A maioria dos procedimentos, novos e antigos, empregados no preparo de amostras envolvem o uso de ácidos concentrados para promoção de ataques agressivos, especialmente sob altas temperaturas e pressões<sup>1</sup>.

Esse tipo de preparo de amostra vai no sentido oposto de um assunto muito discutido atualmente, que é a análise de especiação química. Nesse caso, uma grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento de técnicas que objetivam a minimização do preparo da amostra, com a utilização de reagentes mais brandos e o emprego de estratégias que auxiliem a determinação quantitativa das espécies químicas de um elemento contido em uma amostra, como por exemplo o arsênio<sup>2</sup>.

A análise de especiação química de arsênio em alimentos infantis tem sido foco de muitos estudos, pois envolve a segurança alimentar. Esse interesse na distribuição das espécies químicas de As ocorre porque a sua toxicidade está diretamente relacionada à forma na qual ele se encontra nesses alimentos, já que as formas inorgânicas de As (iAs), arsenito (iAs<sup>III</sup>) e arsenato (iAs<sup>V</sup>) são mais tóxicas que as espécies orgânicas metil-substituídas de As. Nesse tipo de análise, a etapa de preparo da amostra é fundamental, pois é mandatório que a integridade das espécies de As, contidas no alimento, sejam mantidas, a fim de fornecer informações relevantes acerca de sua toxicidade<sup>3-5</sup>.

A maioria dos trabalhos publicados, objetivando a análise de especiação de arsênio em alimentos infantis, foram conduzidos com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (HPLC-ICP-MS). Como os alimentos infantis, majoritariamente, são sólidos ou pastosos, o preparo de amostra, normalmente, envolve uma etapa de extração ácida assistida por radiação micro-ondas, seguida de centrifugação e filtração. Somente depois desse longo processo, que muitas vezes necessita de mais de um dia de preparo de amostra, é que os extratos das amostras são obtidos<sup>3-5</sup>.

Nesse sentido, a utilização da espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e aprisionamento criogênico (HG-CT-AAS) para a análise de especiação química de As em alimentos infantis, surge como uma alternativa, pois possibilita o uso da amostragem direta por suspensão, sendo também, mais acessível e menos onerosa que a técnica de ICP-MS. As técnicas utilizadas no preparo de suspensões são bem mais simples que as de extração tradicional, sendo possível a minimização do preparo da amostra. Além disso, os procedimentos empregados no preparo das suspensões podem ser realizados com reagentes mais brandos, garantindo a integridade das espécies de As contidas na amostra e, ademais, toda a amostra é inserida no sistema, o que reúne vantagens referentes às amostragens sólida e líquida<sup>2,6-8</sup>.

No que tange à análise de combustíveis, uma das técnicas de preparo de amostra mais utilizada é o preparo de emulsões ou micro-emulsões, pois com ela torna-se possível dispersar um material apolar, que é o combustível, em água, com o auxílio de outras substâncias. No entanto, essa abordagem de preparo de amostra envolve a utilização de detergentes e cossolventes, o que pode aumentar as chances de contaminação da amostra, bem como, depreciar o limite de detecção por contaminação do branco. Além do mais, na maioria das vezes, precisa-se dispor de muito tempo para se determinar a proporção dos reagentes e amostra que produzirá uma emulsão ou micro-emulsão que permaneça estável por um tempo suficientemente adequado para a análise<sup>9</sup>.

Outro procedimento utilizado no preparo de amostras de combustíveis, é a extração do analito que, embora, combine vantagens como a separação do analito da matriz e a possibilidade de pré-concentração do analito, também, possui uma série de desvantagens. Dentre esses aspectos negativos, pode-se citar a necessidade do uso de grandes volumes de amostra em relação à substância extratora para que boas eficiências de extração sejam alcançadas, a possibilidade de adsorção do analito nas paredes do frasco e a dificuldade de automação<sup>9</sup>.

No sentido de minimizar o preparo da amostra de combustível é possível a utilização da amostragem direta após uma simples etapa de diluição do combustível. Essa abordagem inclui apenas uma etapa de pesagem e a adição de um solvente à amostra, o que não demanda de muito tempo, podendo ser realizado minutos antes da análise, diminuindo, também, o risco de contaminação da amostra. Além do mais, a diluição possibilita a inserção de volumes diminutos de combustível no forno de grafite, o que é de grande valia quando se trabalha objetivando uma melhor interação analito-modificador químico, como é o caso do S-Pd<sup>9,10</sup>.

Dentre os combustíveis existentes, o óleo diesel, que é o mais utilizado, ocupa uma posição de destaque no que diz respeito às emissões de enxofre para a atmosfera, por estar diretamente relacionado à problemática ambiental. Os óxidos de enxofre ( $\text{SO}_x$ ) formados durante a combustão do óleo diesel, por exemplo, são emitidos para a atmosfera podendo causar chuva ácida, contribuírem para o efeito estufa, além de estarem ligados a diversos problemas de saúde pública<sup>11</sup>. Frente a isso, exigências cada vez mais restritivas, quanto a presença de enxofre nesse combustível, têm sido regulamentadas pela legislação vigente, o que torna necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que apoiem esse controle.

Os métodos indicados pela Agência Nacional de Petróleo (ANP)<sup>12</sup> para o controle do teor de enxofre em combustíveis, baseados na fluorescência de raios-X<sup>13-18</sup> e na fluorescência induzida por ultravioleta<sup>19</sup> possuem equipamentos de dispendiosa aquisição. Nesse sentido, outras técnicas analíticas como a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS)<sup>20</sup>, vem sendo estudada para essa aplicação. Como já foi mencionado anteriormente, as técnicas baseadas na espectrometria de absorção atômica (AAS) são mais simples e menos onerosas e nesse sentido a HR-CS MAS, surge como uma opção pelo baixo custo e facilidade operacional.

Com a possibilidade de resolução das estruturas finas rotacionais das moléculas diatômicas pelo espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, tornou-se possível a determinação de não-metals de forma indireta (HR-CS MAS), como por exemplo, o enxofre, na forma de CS, SH e SnS. No que diz respeito à determinação de enxofre em forno de grafite (HR-CS GF MAS), para obtenção de bons resultados, o analito presente na amostra deve ser estabilizado com a utilização de um modificador químico, para que não seja perdido durante as etapas de secagem e pirólise, mas para que isso ocorra, a interação do analito com esse modificador deve ser efetiva. O preparo da amostra possui um papel essencial nesse processo, pois pode possibilitar de várias formas, essa interação analito-modificador químico<sup>12,21</sup>.

Neste contexto, no presente trabalho serão discutidos o desenvolvimento de estratégias visando a simplificação do preparo de amostra para a análise de especiação de As em formulações infantis, por HG-CT-AAS e para a determinação de enxofre em óleo diesel utilizando a HR-CS GF MAS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR

#### 2.1.1. Arsênio e suas espécies químicas em alimentos

O arsênio pertence ao grupo 15 da tabela periódica e apresenta quatro estados de oxidação, sendo eles -3, 0, +3 e +5. Devido à afinidade do As com o fósforo e enxofre, que são constituintes dos seres vivos, ele apresenta uma elevada toxicidade, inclusive em baixas concentrações<sup>22</sup>.

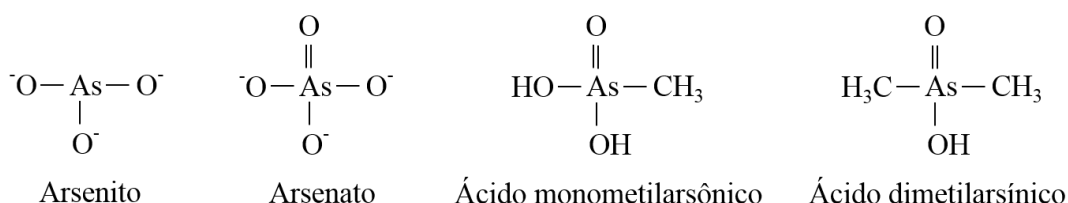
Este elemento está amplamente distribuído na crosta terrestre, na ordem de 3,4-6,0 mg kg<sup>-1</sup>, dependendo da região em questão. É liberado no ambiente por fontes naturais (atividades geológicas e/ou vulcânicas) e antropogênicas. Dentre as fontes antropogênicas estão a mineração de metais não ferrosos, o uso de praguicidas, a combustão do carvão e a incineração do lixo<sup>22-24</sup>.

Em concentrações baixas o arsênio pode ser encontrado no material particulado presente na atmosfera. Nas águas superficiais e para consumo humano, os teores desse elemento são normalmente inferiores a 10 µg L<sup>-1</sup>, podendo alcançar níveis mais elevados em lugares próximos às fontes de emissão ou depósitos minerais de arsênio. Em águas subterrâneas as concentrações variam de acordo com a presença de arsênio nas rochas que compõem o aquífero. Em águas pluviais carbonatadas têm sido relatadas concentrações mais elevadas do elemento, variando de 0,4 a 1,3 mg L<sup>-1</sup> na Nova Zelândia, Romênia, países da antiga União Soviética e Estados Unidos; acima de 1,8 mg L<sup>-1</sup> em Taiwan; e 3,4 mg L<sup>-1</sup> em Córdoba na Argentina<sup>23</sup>.

O arsênio pode ser encontrado nos alimentos de origem agrícola, nas formas inorgânicas, arsenito (iAs<sup>III</sup>) e arsenato (iAs<sup>V</sup>) e em diversas formas orgânicas, sendo as mais comuns, o ácido monometilarsônico (MMAs<sup>V</sup>) e o ácido dimetilarsínico (DMAs<sup>V</sup>) (Figura 1). Nos produtos destinados à alimentação infantil, as espécies de arsênio mais abundantes são: iAs<sup>V</sup>, DMAs e em menores quantidades, também, pode ser encontrado o MMAs, sem especificação do estado de oxidação do arsênio nessas espécies metiladas<sup>5</sup>.



No restante do texto, quando não especificado o estado de oxidação do átomo de As em sua espécie inorgânica, deve ser considerado que se trata do iAs total (iAs<sup>III+V</sup>). Já no caso das espécies metiladas de As, não é comum a indicação do estado de oxidação do átomo de As nessas moléculas, ao menos na análise de especiação química de As em alimentos e, por se tratarem de espécies de baixa toxicidade, essa informação não é considerada relevante.



**Figura 1.** Espécies de arsênio mais comuns encontradas em alimentos de origem agrícola. Adaptado de Maher *et al.*<sup>25</sup>

A toxicidade do As está diretamente relacionada à forma na qual o elemento se encontra (espécie química), sendo que as espécies inorgânicas de arsênio (iAs) são mais tóxicas que as espécies orgânicas desse elemento e com exceção do íon tetrametilarsônico (TeMA), a toxicidade aguda geralmente decresce com o aumento do grau de metilação da espécie de As, como pode ser observado na Tabela I, pelos valores da dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população teste (LD<sub>50</sub>)<sup>24,26</sup>.

**Tabela I.** Valores experimentais da LD<sub>50</sub> para diferentes formas de arsênio. Adaptado de Cornelis *et al.*<sup>26</sup>

Espécies	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> mg kg <sup>-1</sup>	Fórmula molecular
As <sup>III</sup>	14	As(OH) <sub>3</sub>
As <sup>V</sup>	20	OAs(OH) <sub>3</sub>
MMAs <sup>V</sup>	1800	CH <sub>3</sub> AsO(OH) <sub>2</sub>
DMAs <sup>V</sup>	2600	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(OH)

<sup>a</sup> Dose letal mediana, 50%.

Além de ser letal em baixas doses, o iAs é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), no grupo 1, onde estão incluídas as substâncias comprovadamente carcinogênicas aos seres humanos. Isso foi baseado em estudos

epidemiológicos relacionando o iAs à indução do desenvolvimento de câncer de pele, bexiga e pulmões em seres humanos<sup>27</sup>.

O arroz e produtos baseados em arroz, dentre eles, os utilizados em alimentos infantis, por serem muito consumidos e por possuírem concentrações, relativamente, altas de compostos de arsênio, têm ocupado uma posição de destaque no que diz respeito à identificação desses compostos<sup>5,28</sup>. Outrossim, o iAs contido no arroz e produtos produzidos com arroz, depois de ingerido, além de ser mais tóxico, é mais biodisponível do que o DMAs. Em ensaios *in vivo* (em porcos), Juhasz *et al.*<sup>29</sup> relataram que o iAs é altamente absorvido no trato gastrointestinal, com uma biodisponibilidade de 89%, enquanto que para o DMAs esse mesmo valor foi de 33%.

Mesmo sabendo-se que o iAs é mais tóxico que as suas formas orgânicas metiladas, a literatura é bastante escassa de trabalhos que objetivam a análise de especiação química de As em alimentos. A Autoridade Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority*, EFSA) alerta sobre a falta de dados acerca da especiação de As em alimentos, bem como, a de materiais de referência certificados e cita ainda que o maior volume de informações disponibilizado é sobre a concentração de arsênio total (tAs)<sup>30</sup>.

Com exceção de alguns tipos de alimentos provenientes do mar, a maioria deles contém níveis de tAs abaixo dos 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O arsênio encontrado nos organismos marinhos está em sua maior parte na forma de compostos organoarsenicais como a arsenobetaina (AB) que não possuem elevada toxicidade devido à sua baixa reatividade com as estruturas biológicas e à rápida excreção urinária<sup>23</sup>. A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO)<sup>31</sup> cita a presença desse elemento, além de em frutos do mar, em carnes, grãos, e em menor quantidade, nas frutas, vegetais e em produtos alimentícios de uso diário. A concentração de tAs em diferentes grupos de alimentos comercializados na América do Norte é apresentada na Tabela II.

**Tabela II.** Concentração de arsênio total em diferentes grupos de alimentos do Canadá. Adaptado de *World Health Organization*<sup>31</sup>.

Categoria de alimentos	Média	Faixa
	µg As/kg de peso úmido	µg As/kg de peso úmido
Leite e derivados	3,8	<0,4–26,0
Carne e aves	24,3	<1,3–536,0
Peixes e mariscos	1662,4	77,0–4.830,0
Sopas	4,2	<0,2–11,0
Pães e cereais	24,5	<0,1–365,0
Vegetais	7,0	<0,1–84,0
Frutas e sucos de frutas	4,5	<0,1–37,0
Gorduras e óleos	19,0	<1,0–57,0
Açúcar e doces	10,9	1,4–105
Bebidas <sup>a</sup>	3,0	0,4–9,0
Variados <sup>b</sup>	12,5	<0,8–41,0

<sup>a)</sup> Inclui café, chá, refrigerantes, vinho e cerveja engarrafada e enlatada.

<sup>b)</sup> Inclui *muffins* de farelo, *muffins* com e sem passas, gelatina, passas, feijão cozido e beterraba crua e cozida.

Os compostos de arsênio foram utilizados por muito tempo na agricultura e silvicultura como inseticida ou herbicida. Dentre outros usos pode-se citar: estimulante de crescimento vegetal, controle de carrapatos e moscas em ovinos, preservante de madeira, dessecante de algodão e corante. Embora esse uso seja proibido atualmente, os solos de algumas regiões foram amplamente contaminados devido à utilização intensiva desses compostos de arsênio no passado e, devido a isso, as plantas cultivadas nesses locais absorvem esses compostos do solo que acabam sendo distribuídos e acumulados nos vegetais<sup>26,32</sup>.

A absorção dos compostos de arsênio nas plantas ocorre pelos mesmos sítios de absorção do fosfato nas raízes, por estes compostos serem quimicamente análogos. Os compostos de arsênio também são assimilados pelos sítios de absorção do silício e os cultivares de arroz, por serem conhecidos como grandes acumuladores de Si possuem, portanto, tendência a acumularem grandes quantidades de arsênio. O fato das plantações de arroz serem em sua maioria de arroz irrigado contribui ainda mais para a absorção desse elemento, pois a mobilidade desses compostos aumenta nos solos encharcados devido às condições anaeróbias. Além disso, o uso de adubo orgânico nessas plantações, resulta em um incremento da matéria orgânica. Como consequência desse incremento, há

um aumento da atividade microbiana do solo, que por sua vez, contribui para a mobilidade dos compostos de arsênio levando a uma maior absorção, dessas espécies, pelas plantas<sup>33</sup>.

Em um estudo sobre as diferentes formas de As que podem ser encontradas em vegetais, temperos e arroz provenientes da Índia, Signes-Pastor *et al.*<sup>34</sup> relataram o iAs<sup>III</sup> como a única forma desse elemento em feijão, tomate, cebola, couve-flor e berinjela. Em cenoura e radite foi encontrado também MMAs representando entre 20-39% do total de arsênio contido nas amostras. Já em temperos como coentro, açafraão e feno-grego, o MMAs representou 46%, 66% e 82% do total de arsênio contido nas amostras, respectivamente. Não foi detectado DMAs nos vegetais e temperos, o que difere do que normalmente é observado no arroz, por exemplo, onde essa é a forma metilada de arsênio mais abundante<sup>2,34</sup>.

Dessa forma, é de suma importância dispor de métodos que tornem possível a separação e quantificação das diferentes espécies químicas de As, mesmo quando as mesmas estejam presentes em baixas concentrações, visto que a análise de tAs não fornece informações relevantes sobre a possível toxicidade dos alimentos.

#### 2.1.1.1. Legislação

A Resolução RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>35</sup> brasileira, dispõe sobre o regulamento técnico no âmbito do MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Nessa legislação, dentre os tipos de alimentos relacionados estão: cereais e produtos de ou a base de cereais, excluídos trigo, arroz e seus produtos derivados e óleo, com o limite de 0,3 mg kg<sup>-1</sup> de iAs; trigo e seus derivados, exceto óleo, com limite de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de iAs; arroz e seus derivados, exceto óleo, com limite de 0,3 mg kg<sup>-1</sup> de iAs. Portanto, a legislação brasileira não trata especificamente sobre o limite máximo de iAs em alimentos infantis.

Na União Europeia, também não existia uma legislação específica que tratasse dos níveis de iAs em produtos alimentícios infantis. O que existia era uma recomendação da WHO sobre a quantidade de iAs que poderia ser ingerida diariamente por cada quilo de massa corporal - ingestão diária máxima tolerável provisória (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intakes*, PMTDI) -, que era de 2,1 µg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, sem menção à idade<sup>36</sup>.

Em 2015, foi publicado o Regulamento (EU) 2015/1006 da Comissão Europeia, de 25 de junho de 2015, que alterou o Regulamento nº 1881/2006, incluindo teores

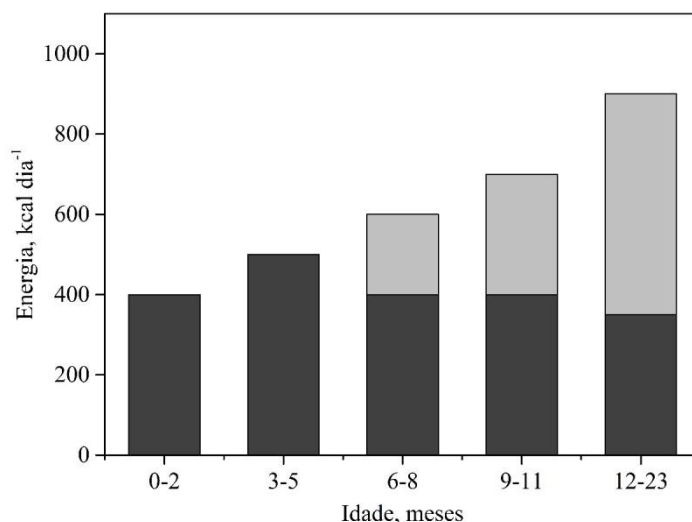
máximos de arsênio, na forma inorgânica, nos gêneros alimentícios<sup>37</sup>. O texto da legislação menciona as observações da EFSA<sup>30</sup>, de que crianças com menos de três anos de idade eram mais expostas ao iAs, devido à ingestão de produtos que tinham como base o arroz e determinou os limites máximos de iAs para os seguintes produtos: arroz para produção de alimentos destinados à lactentes e crianças jovens, limite máximo de 0,10 mg kg<sup>-1</sup>; arroz branqueado não parboilizado (polido ou branco), limite máximo de 0,20 mg kg<sup>-1</sup>; arroz parboilizado e descascado, limite máximo de 0,25 mg kg<sup>-1</sup>; *waffles* de arroz, limite máximo de 0,30 mg kg<sup>-1</sup>.

Nos Estados Unidos da América não existe uma legislação que defina os níveis máximos de iAs em alimentos, existe um limite definido apenas para iAs em água potável<sup>38</sup>. Já na República Popular da China o limite máximo de iAs permitido no arroz é de 0,15 mg kg<sup>-1</sup><sup>39</sup>.

Frente a essas exigências, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que apoiem esse controle, sendo possível, dessa forma, identificar e quantificar as diferentes espécies químicas de As nos alimentos, principalmente a espécie inorgânica de As, para que seja possível avaliar sua toxicidade, para proteger, principalmente, a parte da população mais exposta, que são os bebês e crianças.

### **2.1.1.2. Arsênio em alimentos infantis**

O aleitamento materno é a principal e mais adequada forma de alimentação indicada para crianças até o sexto mês de vida<sup>40,41</sup>. Após esse período, outros tipos de alimentos são recomendados para complementar o leite materno, fornecendo energia (Figura 2) e micro e macronutrientes para o desenvolvimento da criança e, na maioria das vezes, os alimentos infantis comerciais são utilizadas para essa finalidade<sup>41,42</sup>. É importante mencionar que o risco de exposição de bebês e crianças a compostos tóxicos é maior porque eles consomem, relativamente, mais alimentos que um adulto, devido às suas altas taxas metabólicas<sup>3,22,28</sup>.



**Figura 2.** Energia requerida, de acordo com a idade, (■) proveniente do leite materno e de (■) fontes complementares. Adaptado da Organização Mundial da Saúde<sup>41</sup>.

A alimentação complementar para a maioria dos bebês, após os seis meses de vida, é realizada com mingaus produzidos a partir de arroz pré-cozido, seco e moído<sup>43</sup>. Com o desenvolvimento da criança, esse mingau é utilizado como a refeição base onde é adicionado purê de frutas e vegetais. Muitos produtos alimentícios destinados à alimentação infantil como biscoitos, cereais e papinhas, também, possuem arroz ou farinha de arroz em sua composição<sup>44</sup>.

O uso abundante de alimentos baseados em arroz na dieta de bebês, a partir dos seis meses de idade, pode explicar, em parte, o motivo pelo qual o nível de arsênio determinado em cabelos de crianças, com 1 ano de idade, foi 12,5 vezes maior que o encontrado em bebês com 1 mês de vida<sup>45</sup>.

A Autoridade Alimentar do Reino Unido (*United Kingdom Food Standard Agency*, UK FSA) orientou que não fosse dado a crianças menores que 54 meses leite de arroz como substituto ao leite materno, leite de vaca ou fórmulas infantis (substitutas do leite materno)<sup>46</sup>, pois o uso frequente do alimento poderia levar a uma ingestão de iAs maior que a PMTDI recomendada pela WHO (*World Health Organization*)<sup>47</sup>.

Mesmo não apresentando dados específicos acerca do teor de iAs em alimentos para bebês, a WHO relatou que a faixa de concentração de tAs, em 75 diferentes alimentos desse tipo, foi de 0,001-4,66 mg kg<sup>-1</sup>, mas não foi especificada sua composição<sup>48</sup>.

Devido a introdução de alimentos, que possuem como base o arroz, na dieta dos bebês com mais de 6 meses de idade, vários estudos foram realizados para quantificar tAs. Nesse sentido, Ljung *et al.*<sup>28</sup> analisaram tAs em 8 alimentos para bebês

comercializados no Reino Unido, dos quais, 5 eram a base de arroz e os outros 3 eram a base de trigo, semolina e aveia. Para os alimentos a base de arroz a faixa de concentração de tAs foi de 17-33  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e nos outros alimentos foi de 1,0-3,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Em outro trabalho, Burló *et al.*<sup>49</sup> encontraram diferentes resultados de tAs, em alimentos infantis comercializados na Espanha. Nesse estudo, a faixa de concentração de tAs, nos alimentos a base de arroz, ficou entre 43-80  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e nos alimentos a base de cereais, essa faixa foi de 9-39  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os autores fizeram, também, uma curva de correlação onde ficou evidente que a concentração de tAs estava diretamente relacionada à quantidade de arroz presente na composição do alimento.

Recentemente, Llorente-Mirandes *et al.*<sup>50</sup> determinaram tAs em 8 produtos multicereais e 1 pó para mingau composto apenas por arroz (*single grain rice-based*) comercializados na cidade de Barcelona, Espanha. O teor de tAs nas amostras de multicereais foi de 7,7-35,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com um valor médio de 18  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Já na amostra de pó para mingau que continha mais de 90% de arroz em sua composição, o teor de tAs foi de  $267,4 \pm 11,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , o que representa um aumento de uma ordem de magnitude em relação aos produtos multicereais.

A EFSA, no ano de 2009, revisou os dados relativos à dieta da população da União Europeia e apontou em um relatório, a necessidade da produção de dados sobre a especiação de arsênio, particularmente, de iAs (forma mais tóxica), para os diferentes tipos de alimentos comercializados no bloco europeu. Dentre as conclusões do relatório da EFSA, uma delas foi a de que crianças com menos de três anos de idade eram mais expostas ao iAs, devido à ingestão de produtos que tinham como base o arroz<sup>30</sup>.

### 2.1.2. Análise de especiação química de arsênio em alimentos infantis

A palavra especiação de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*), se refere à distribuição das diferentes espécies químicas de um determinado elemento em uma amostra<sup>51</sup>. Já o termo análise de especiação, tem como conceito a atividade analítica de identificar e quantificar individualmente uma ou mais espécies químicas de uma amostra<sup>52</sup>.

É importante mencionar que a análise de especiação química de As é considerada um desafio, principalmente, quando se trata da análise de amostras de alimentos. Esse fato é atribuído à complexidade da matriz orgânica desse tipo de amostra, pois as espécies

químicas devem se manter em sua forma original para que se possa obter dados representativos sobre a realidade da amostra<sup>2</sup>. As restrições analíticas, citadas pelo WHO, incluem a falta de métodos validados para a análise de especiação de As em alimentos e a falta de materiais de referência de alimentos com concentrações certificadas para as diferentes espécies de As<sup>48</sup>. Outro fato relevante, é que pelo iAs ser de distribuição ubíqua, a análise de especiação química desse elemento pode ser problemática (altos limites de detecção)<sup>53</sup>.

#### ***2.1.2.1. Técnicas analíticas utilizadas para a análise de especiação química de As em alimentos infantis***

O desenvolvimento tecnológico na área da química analítica instrumental, tornou possível a identificação e quantificação das diferentes espécies químicas de As presentes em uma amostra. Embora existam técnicas analíticas que possibilitaram a análise de especiação de As, o número de trabalhos publicados utilizando alimentos infantis como amostras, ainda é bem limitado.

Na maioria dos trabalhos, além da determinação das espécies químicas de As, também é feita a análise de tAs, para que possa ser feito o cálculo de recuperação do analito a partir da soma das espécies medidas (balanço de massa). Na seção 2.1.1.2 foram apresentadas concentrações de tAs em alimentos infantis. Essas determinações foram realizadas com o uso da espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) nas amostras decompostas por digestão ácida assistida por micro-ondas<sup>28,49,50</sup>.

Já no que diz respeito à análise de especiação química de As, é preciso a utilização de uma técnica que permita a separação das espécies de As em uma etapa prévia ao sistema detecção. Nesse sentido, geralmente são utilizadas técnicas de separação baseadas em métodos cromatográficos. Pode-se citar o uso da cromatografia líquida (LC)<sup>54</sup>, cromatografia iônica (IC)<sup>50</sup> e cromatografia de troca iônica (AEC)<sup>55</sup> como técnicas de separação utilizadas para a separação das espécies de As em alimentos infantis, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)<sup>3-5,56</sup> a mais utilizada.

Já a detecção de As, na maioria dos trabalhos é realizada com a técnica de ICP-MS, sendo, portanto, necessário o acoplamento da técnica de separação com essa técnica de detecção. Dentre essas técnicas acopladas, usadas na análise de especiação química de As em alimentos infantis, a mais utilizada é o HPLC-ICP-MS<sup>3-5,56</sup>.



Para a análise de especiação química de As, independentemente do tipo de técnica que irá se utilizar, é necessário que se utilize uma etapa de pré-tratamento da amostra e, para isso, os métodos de extração ou decomposição são os mais utilizadas. É mandatório que o método de preparo de amostra escolhido, mantenha a integridade das espécies de As, contidas nas amostras.

O reagente mais empregado na extração de espécies de As em matrizes complexas de alimentos infantis é o ácido nítrico<sup>4,5,55,56</sup> em soluções diluídas e também com o emprego de outros reagentes em conjunto, como o peróxido de hidrogênio<sup>50,54</sup>. Dentre outros reagentes testados e utilizados, pode-se citar o ácido trifluoroacético (TFA)<sup>3</sup>, ácido clorídrico<sup>57</sup>, ácido fosfórico<sup>57</sup>, ácido acético<sup>57</sup>, metanol-H<sub>2</sub>O (1:1)<sup>57</sup> e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH)<sup>58</sup>. Além de diferentes reagentes, também são utilizados alguns procedimentos que auxiliam a extração das espécies de As, como: agitação assistida por ultrassom<sup>57,58</sup>, extração assistida por micro-ondas<sup>4,50,54-56,59</sup>, agitação mecânica<sup>50</sup> e aquecimento<sup>3,5,58</sup>.

Em um trabalho que objetivou a especiação de As em arroz para bebês (pó para mingau) por HPLC-ICP-MS, Meharg *et al.*<sup>3</sup>, utilizaram uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol L<sup>-1</sup> e aquecimento para a extração das espécies de As. Os autores reportaram que a faixa de concentração da espécie tóxica, iAs, foi de 0,06-0,16 mg kg<sup>-1</sup>, com um teor médio de 0,11 mg kg<sup>-1</sup>. Das 17 amostras analisadas, 8 apresentaram teores de iAs maiores que o limite estabelecido pela legislação europeia (0,1 mg kg<sup>-1</sup>). Já a concentração de DMAs, espécie menos tóxica de As, ficou na faixa de 0,03-0,23 mg kg<sup>-1</sup>. Os autores não reportaram a presença de MMAs nas amostras analisadas e a recuperação de As variou de 56,1 a 113,1%.

Llorente-Mirandes *et al.*<sup>54</sup> determinaram iAs, MMAs e DMAs em 29 amostras espanholas de alimentos infantis produzidos com arroz, por LC-ICP-MS. Como método de extração foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,2% (m/v) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (m/v) sob aquecimento em um forno de micro-ondas, a 95°C por 45 min. Os teores de iAs e DMAs nas amostras analisadas variaram de 24,2 a 238,9 µg kg<sup>-1</sup> e 11,1 a 182,6 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que para a espécie MMAs as concentrações, em todas as amostras, ficaram abaixo do LOQ (10 µg kg<sup>-1</sup>). Para o iAs e o DMAs foram calculados LOQs do método de 20 e 10 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Em 15 das 29 amostras analisadas a concentração da espécie tóxica iAs, excedeu o limite de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, estabelecido pela legislação europeia. A recuperação de As ficou entre 81,4 e 102,7%.

Em outro estudo, Jackson *et al.*<sup>55</sup> determinaram iAs em 18 amostras de papinhas para bebês, comercializadas em Hanover (EUA), por HPLC-ICP-MS. Para a extração das espécies de As foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 1% (m/v) com aquecimento em forno de micro-ondas, a 95°C por 30 min. Os teores de iAs ficaram entre 5,71 e 16,92 µg kg<sup>-1</sup>. Não foi relatada a presença de MMAs e DMAs nas amostras. Um fato interessante é que os autores identificaram, a partir das informações do rótulo, quais amostras continham arroz em sua composição e nelas foram encontradas as concentrações mais elevadas de iAs. A recuperação de As variou de 67 a 133%.

Carbonell-Barrachina *et al.*<sup>56</sup> determinaram iAs e DMAs em 46 amostras de alimentos infantis espanhóis, por HPLC-ICP-MS. Os compostos de arsênio foram extraídos das amostras por uma solução de HNO<sub>3</sub> 1% (m/v) aquecida em um forno de micro-ondas, a 95°C por 30 min. As concentrações de iAs ficaram entre 11 e 121 µg kg<sup>-1</sup>. É importante salientar que das 5 amostras com composição 100% de arroz, 3 delas apresentaram teores de iAs maiores que o limite de iAs determinado pela EU (0,1 mg kg<sup>-1</sup>). Em relação ao DMAs, as concentrações dessa espécie ficaram entre 5 e 198 µg kg<sup>-1</sup>. Os LOQs instrumentais foram de 5 µg kg<sup>-1</sup> para iAs e DMAs. Os autores não calcularam a recuperação de As.

Juskelis *et al.*<sup>5</sup>, também utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS, analisaram 31 amostras de diferentes alimentos infantis produzidos nos Estados Unidos. Para extração dos compostos de arsênio foi utilizado HNO<sub>3</sub> 0,28 mol L<sup>-1</sup> sob aquecimento em um bloco digestor, a 95°C por 90 min. As concentrações de iAs encontradas ficaram entre 55,5-158 µg kg<sup>-1</sup> e em 10 delas o teor de iAs determinado foi maior que o limite de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, estabelecido pela UE. Os teores de DMAs nessas amostras variaram de 15,9 a 206 µg kg<sup>-1</sup>. Os autores encontraram, também, MMAs em 29 das amostras analisadas com concentrações de 1,2-8,9 mg kg<sup>-1</sup>. Os LOQs instrumentais foram de 13,1, 9,2 e 6,8 µg kg<sup>-1</sup> para iAs, MMAs e DMAs, respectivamente. A recuperação de As variou de 85,8 a 106%.

A análise de especiação química de As em 10 tipos de alimentos infantis finlandeses, produzidos com arroz, foi realizada por Rintala *et al.*<sup>4</sup> utilizando HPLC-ICP-MS. Como preparo de amostra, foi utilizada a extração ácida assistida por radiação micro-ondas e uma solução de HNO<sub>3</sub> 1% (não foi especificado a utilização de m/v ou v/v), a uma temperatura de 95°C por 30 min. O iAs foi detectado em 4 das 10 amostras analisadas, em uma faixa de concentração que variou entre 0,07 e 0,21 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que apenas uma amostra apresentou uma concentração de iAs (0,21 mg kg<sup>-1</sup>) superior ao

limite estabelecido pela legislação europeia ( $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Nas outras 6 amostras, os teores de iAs ficaram abaixo do LOQ/LOD, que foram de  $0,06$  e  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Embora tenha sido relatada a presença de DMAs em algumas amostras, essa espécie não foi quantificada. Os autores relataram algumas desvantagens da utilização de tampões de carbonato como eluentes na separação das espécies de As por HPLC, como o longo tempo de retenção (45 min de tempo de análise, excluindo-se o preparo da amostra) e o alargamento do pico da espécie iAs<sup>V</sup>.

Em um outro trabalho, Llorente-Mirandes *et al.*<sup>50</sup> determinaram iAs, MMAs e DMAs em 9 amostras compradas na cidade de Barcelona, das quais, 7 eram de multicereais, 1 de trigo orgânico para mingau (pó) e 1 de arroz para mingau (pó), porém utilizando a técnica de IC-ICP-MS. Para o preparo das amostras foi utilizado o mesmo método de extração aplicado no trabalho descrito anteriormente, realizado pelos mesmos autores<sup>54</sup>. Os resultados de iAs variaram de  $10,5$  a  $26 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , para as amostras multicereais. Nas amostras de trigo orgânico e arroz os teores de iAs foram de  $8,1 \pm 1,3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $74,3 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente, estando em conformidade com o limite determinado pela legislação europeia ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Na amostra de arroz também foram encontradas concentrações de  $6,3 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $175 \pm 3,7 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de MMAs e DMAs, respectivamente. Os LOQs instrumentais foram de  $1,2$ ,  $0,9$  e  $1,1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  para iAs, MMAs e DMAs, respectivamente. A recuperação de As ficou entre  $94$  e  $108,3\%$ .

Apesar das vantagens relativas ao uso da detecção com o ICP-MS, como baixos limites de detecção, a técnica possui alto custo e não está disponível em todos os laboratórios. Além do mais, quando é utilizada acoplada a uma técnica cromatográfica (IC, AEC, LC ou HPLC), os alimentos infantis precisam ser submetidos a um método de preparo de amostra que objetiva a extração das espécies de As. Esses, métodos são morosos, pois envolvem, geralmente, uma extração ácida, muitas vezes assistida por micro-ondas, centrifugação e filtração. Nesse sentido, outras técnicas sensíveis como a geração de hidretos (HG) combinada com diferentes tipos de detecção, como espectrometria de absorção atômica (AAS) ou espectrometria de fluorescência atômica (AFS), surgem como uma alternativa, pela sua simplicidade, baixo custo e possibilidade de minimização das etapas de preparo de amostra. A utilização da HG é vantajosa para quantificação de As por promover uma separação do analito da matriz da amostra, reduzindo possíveis interferências químicas e espectrais no atomizador, além de permitir a pré-concentração e de ser uma técnica com sensibilidade adequada para determinação de As em amostras de alimentos infantis. Além do mais, por esse tipo de alimentos serem

sólidos ou pastosos, a utilização dessa técnica permite a utilização das amostras na forma de suspensões, que envolve métodos mínimos, rápidos e brandos de preparo de amostra<sup>2,6,60</sup>.

Matos-Reyes *et al.*<sup>57</sup> utilizaram a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS) para a análise de especiação de As em amostras de cereais comercializados na cidade de Valência, Espanha. Os autores não utilizaram nenhuma técnica de separação prévia à detecção por AFS. O método foi baseado na geração seletiva de hidretos com o emprego de soluções HCl e do redutor tetrahidroborato de sódio com o uso de 5 concentrações diferentes (de cada um deles) e pela adição ou não dos pré-redutores iodeto de potássio e ácido ascórbico. Após a coleta dos dados, de cada uma das condições empregadas, foi utilizada uma série de equações proporcionais que levava em conta a sensibilidade das espécies de As nas diferentes condições reacionais testadas na HG para o cálculo das concentrações de  $iAs^{III}$ ,  $iAs^V$ , MMAs e DMAs. Os autores relataram uma concentração de  $iAs$  de  $79 \mu g kg^{-1}$  e  $80 \mu g kg^{-1}$  nas amostras de arroz e semolina, respectivamente. As concentrações de MMAs e DMAs foram ambas inferiores a  $5 \mu g kg^{-1}$  para as duas amostras. A recuperação de As foi de 81 e 98% nas amostras de arroz e semolina, respectivamente. É importante salientar que os autores estudaram diferentes métodos de preparo da amostra na forma de suspensão, isto é, soluções de diferentes reagentes mediante agitação ultrassônica, sendo eles: HCl  $6 mol L^{-1}$ ,  $HNO_3$   $1 mol L^{-1}$ , ácido acético  $1 mol L^{-1}$ ,  $H_3PO_4$   $1 mol L^{-1}$ , água régia, TFA  $2 mol L^{-1}$  e uma mistura de metanol e água (1:1). Embora as amostras tenham sido preparadas na forma de suspensão, os autores relatam que as mesmas passaram por centrifugação e somente o sobrenadante foi analisado. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização das soluções de HCl e de  $H_3PO_4$ .

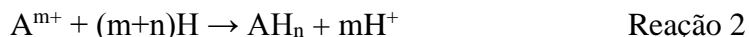
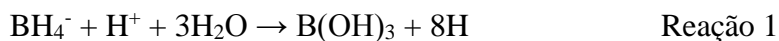
### 2.1.3. Espectrometria de Absorção atômica com geração de hidretos

A utilização da geração de hidretos (HG) acoplada à espectrometria de absorção atômica foi citada primeiramente por Holak<sup>61</sup>, em 1969, na determinação de arsênio. A partir desse momento, a técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), vem sendo utilizada para a determinação de arsênio, antimônio, bismuto, estanho, germânio, selênio, telúrio e chumbo devido sua simplicidade, sensibilidade e seletividade<sup>60</sup>.

A base da HG AAS é a conversão do analito ao seu hidreto volátil gasoso para posterior introdução em um atomizador. Quanto à utilização da HG AAS, pode-se citar como vantagens: a separação do analito da matriz, o emprego de elevados volumes de amostra, o relativo baixo custo operacional, a possibilidade de pré-concentração do analito na fase gasosa, a viabilidade da análise de especiação, a geração seletiva dos hidretos, bem como, a automação do sistema. Entretanto, o fato de poucos elementos formarem hidretos voláteis estáveis à temperatura ambiente pode ser citado como uma limitação da técnica de HG AAS. A técnica de HG AAS é composta por três etapas distintas, sendo elas: *(i)* o preparo da amostra, *(ii)* a geração do hidreto volátil e *(iii)* a atomização/detecção<sup>6,62-64</sup>.

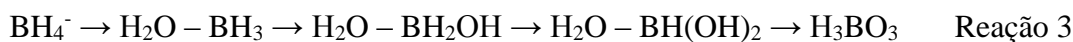
Existem três modos diferentes da geração de hidretos (HG): fluxo contínuo, injeção em fluxo e batelada. Essa geração consiste na formação e desprendimento do hidreto da solução da amostra, isto é, o analito presente na amostra é convertido a hidreto e após sua liberação para a fase gasosa, o mesmo é conduzido até o atomizador/detector, com o auxílio de um gás de arraste. No que diz respeito à HG, elementos como o antimônio, arsênio, selênio e telúrio, que geralmente estão presentes nas amostras em suas formas oxidadas (maiores estados de oxidação), necessitam ser pré-reduzidos previamente à HG, para que possam ser convertidos aos seus respectivos hidretos. Os procedimentos mais empregados para a pré-redução dos analitos, como As<sup>V</sup> e Sb<sup>V</sup>, envolvem a utilização de iodeto de potássio e/ou ácido ascórbico e a L-cisteína<sup>62</sup>.

Muitas reações químicas podem ser empregadas para converter o analito, presente em uma amostra, a hidreto. Nos primórdios da técnica de HG a redução do As<sup>III</sup> era realizada por Zn metálico em uma solução de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. Entretanto, no presente, essa forma de geração de hidretos não é mais utilizada devido à reação com o uso do tetrahidroborato de sódio (THB) em meio ácido (geralmente HCl) apresentar maior rendimento de redução, menor tempo de reação e menor contaminação dos brancos. Além do mais, menores quantidades do THB são necessárias no meio reacional, visto que sua decomposição é completa e ocorre rapidamente. Contudo, a eficiência da reação, durante a HG, depende do controle do pH do meio reacional, não podendo ocorrer mudanças significativas na sua acidez e, também, de temperatura e volume. O mecanismo da reação de redução com o THB foi amplamente discutido na literatura ao longo dos anos e por muito tempo o mecanismo do “hidrogênio nascente”, foi o mais aceito. Nesse mecanismo, o BH<sub>4</sub><sup>-</sup>, em meio ácido, era decomposto rapidamente em ácido bórico e hidrogênio nascente através das reações<sup>6,62</sup>:



A decomposição do THB se completa após poucos microssegundos em meio ácido e nesse mecanismo, o hidrogênio nascente reduzia o analito (A) a hidreto resultante da Reação 1. Esse mecanismo, mesmo sendo empírico, foi geralmente aceito, até a proposição do mecanismo baseado na transferência direta do hidrogênio<sup>6,62</sup>.

No mecanismo de transferência do hidrogênio, ocorre a transferência direta do hidrogênio do átomo de boro para o átomo do analito, através da formação de um complexo do tipo analito-hidreto de boro. O mecanismo é baseado em duas cadeias de reações: na primeira o  $\text{BH}_4^-$  é hidrolisado formando ácido bórico via três intermediários hidrolíticos; e na segunda, ocorre a transferência do hidrogênio para o analito (como exemplo foi utilizada a formação da arsina)<sup>6,62</sup>. A representação das reações é:



Na Reação 3, em cada passo, ocorre a perda de uma ligação B–H e cada uma dessas quatro espécies de hidreto de boro (HB) presentes na mistura reacional, pode transferir um hidrogênio para o analito, substituindo um de seus grupos hidroxila, como pode ser visto na Reação 4, tendo como resultado a geração do hidreto do analito<sup>6,62</sup>.

O controle do pH do meio reacional durante a HG, é uma ferramenta que pode ser utilizada para a geração seletiva de hidretos, isto é, pode-se promover a formação de hidretos a partir do analito com diferentes estados de oxidação. Essa abordagem se utiliza do fato da geração de hidretos, como as arsinas, ser favorecida para as espécies de As protonadas e pelos valores de  $\text{p}K_a$  para as espécies  $\text{iAs}^{\text{III}}$  e  $\text{iAs}^{\text{V}}$  serem diferentes. Com isso, a baixos valores de pH (perto de 1) a reação com THB irá gerar arsinas a partir das espécies tri- e pentavalentes (incluindo-se também as espécies metiladas), enquanto que em um pH mais alto (acima de 6) as espécies pentavalentes se ionizam (desprotonação) e as arsinas são formadas somente a partir das espécies trivalentes. Após se obter os resultados com a utilização do pH baixo e alto, as quantidades das espécies de  $\text{As}^{\text{III}}$  e  $\text{As}^{\text{V}}$  podem ser calculadas por subtração<sup>65-68</sup>. Essa ferramenta já foi utilizada para análise de

espeiação de As em materiais biológicos<sup>53,69</sup>, incluindo o estudo de metabólitos de As em seres vivos<sup>70</sup> e amostras ambientais<sup>65,71</sup>. Entretanto, alguns autores relataram como uma dificuldade dessa abordagem, as distintas sensibilidades obtidas para as espécies de As, e em virtude disso, foi necessário a construção de curvas de calibração para cada uma das espécies de As geradas em pH 1 e 6, o que despendeu de muito tempo<sup>69,70</sup>.

Com intuito de superar essa dificuldade e facilitar o procedimento de calibração, o grupo de pesquisa do Prof. Jiří Dědina propôs a utilização da geração seletiva de HG na presença ou ausência de uma etapa de pré-redução das espécies de As, com o emprego de um agente pré-redutor. Para a pré-redução do  $iAs^V$ , normalmente, era utilizado o iodeto de potássio combinado com o ácido ascórbico, ou com uma alta concentração de HCl, mas devido à baixa estabilidade e necessidade da utilização de altas concentrações de KI e HCl, para que a pré-redução fosse completa, os autores sugeriram o uso da L-cisteína-HCl. Essa substância reduz as espécies pentavalentes de As para suas formas trivalentes e reage com eles formando derivados de arsenotiol e, além disso, aumenta a eficiência da HG pela formação de borano complexos. Como consequência da pré-redução se obtém uma uniformização das sensibilidades das espécies de  $iAs^V$ ,  $MMA^V$  e  $DMA^V$  possibilitando, assim, que a curva de calibração seja construída com apenas uma única espécie de As. Por outro lado, em virtude da HG ser eficiente apenas em uma pequena faixa de concentração de HCl (0,01-0,1 mol L<sup>-1</sup>), com o emprego da L-cisteína, os autores propuseram o uso de uma solução tampão de Tris-HCl 0,75 mol L<sup>-1</sup>, com pH 6, o que permitiu um maior controle do pH do meio reacional durante a HG e eliminou o problema de utilização da L-cisteína para a pré-redução<sup>53,72,73</sup>.

Nessa abordagem, a amostra foi separada em duas alíquotas: (*i*) onde era adicionada a L-cisteína e, portanto, todas as espécies de As foram pré-reduzidas às suas formas trivalentes; e (*ii*) onde o pré-redutor não foi adicionado e as arsinas foram geradas apenas a partir das espécies de As trivalentes. Dessa forma, os resultados obtidos para as espécies de As na alíquota *i* correspondiam à soma das espécies trivalentes e pentavalentes e na alíquota *ii*, representavam apenas as espécies trivalentes. No final, por diferença dos resultados obtidos em *i* e *ii*, foram calculados os valores referentes às espécies pentavalentes na amostra<sup>53</sup>.

Sempre se utiliza um excesso de várias ordens de grandeza do agente redutor em relação ao analito, na geração de hidretos. Esse excesso, gera um grande volume de hidrogênio que transfere o hidreto formado da mistura reacional para a fase gasosa. Normalmente é utilizado um gás de arraste, que é inserido na mistura de

reagentes/amostra antes de sua entrada no separador gás-líquido (GLS), ou pode ser também, borbulhado na mistura reacional, dentro do GLS. Esse gás ajuda na liberação dos hidretos do meio líquido, diminuindo a necessidade de altas concentrações de THB e, também, auxilia no carreamento dos hidretos gerados<sup>6</sup>.

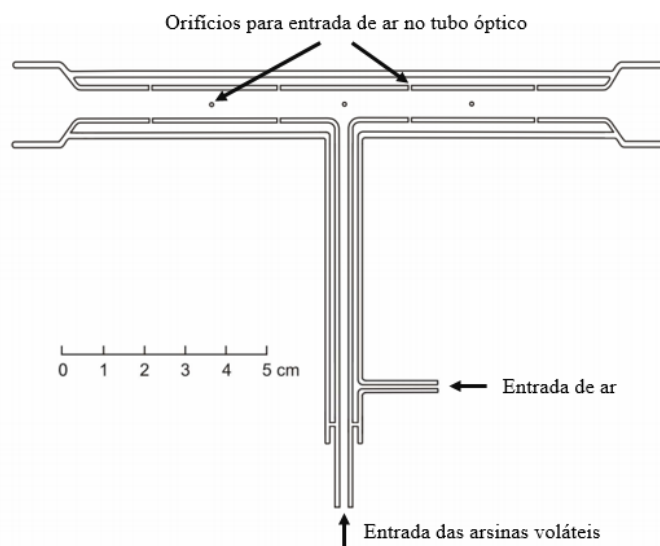
Após a geração dos hidretos, os mesmos são transportados com o auxílio de um gás de arraste para o atomizador/detector. Existem vários tipos de atomizadores que podem ser utilizados para a atomização do analito (na forma de hidreto) em um instrumento de AAS, são eles: tubo de quartzo (QTA), forno de grafite, chama difusa, atomizadores metálicos e chama com gás de proteção. A atomização em forno de grafite na HG AAS se consolidou na metade dos anos 90 e, desde então, juntamente com o QTA, divide a posição de atomizador mais utilizado<sup>6,62</sup>.

Levando em conta a análise de especiação química de arsênio (inorgânico e orgânico), a atomização não pode ser realizada no forno de grafite, visto que sua utilização envolve uma etapa de coleta “*in situ*” na parede do tubo de grafite ou plataforma integrada do tipo PIN e dessa forma, o As proveniente das diferentes espécies químicas, seria atomizado simultaneamente. Nesse caso, a utilização de atomizadores do tipo QTA é mais indicada, pois possibilita a atomização dos hidretos assim que os mesmos são introduzidos no tubo óptico, visto que eles são aquecidos continuamente (900 °C) por meio de uma chama ou resistência elétrica, ambas externas. Além do mais, os QTAs possibilitam um maior tempo de permanência dos átomos livres no caminho óptico, aumentando a sensibilidade.

O mecanismo de atomização no QTA é baseado na formação de hidrogênio radicalar proveniente da reação do hidrogênio, que é advindo da decomposição do THB, e traços de oxigênio presente na amostra e/ou gás de arraste. As desvantagens mais relevantes inerentes ao QTA são a suscetibilidade a interferências na etapa de atomização e, normalmente, a reduzida linearidade das curvas de calibração. Os problemas relacionados à utilização desse atomizador devem-se ao fato dos átomos no estado fundamental, serem suscetíveis a reagir quimicamente, após saírem da nuvem atômica, ainda dentro do QTA. Isso ocorre em virtude de a nuvem atômica estar mais concentrada no ponto de confluência dos gases, localizado no centro tubo óptico, onde a formação de hidrogênio radicalar é mais intensa. A densidade desses radicais hidrogênio vai diminuindo ao longo do tubo óptico, nas duas direções, ocasionando esse problema<sup>62,74-76</sup>.



Com o objetivo de solucionar as dificuldades observadas com o uso do QTA convencional, Dědina e Matoušek<sup>75,76</sup> propuseram um novo atomizador que é apresentado na Figura 3. O multiatomizador (*multiatomizer – multiple microflame quartz tube atomizer*), foi idealizado para aumentar a produção de hidrogênio radicalar a partir de microchamas formadas nos orifícios espalhados ao longo do tubo de quartzo interno. Sendo assim, o atomizador é composto por dois tubos de quartzo concêntricos (145 mm de comprimento e 6 mm de d.i.), com orifícios posicionados na parede do tubo interno (tubo óptico), como pode ser visto na Figura 3. O tubo externo não possui orifícios e pelo espaço existente entre os dois tubos é introduzido ar comprimido com o objetivo de fornecer oxigênio para a formação de microchamas. Quando o oxigênio do ar entra em contato com gás hidrogênio que está na parte interna do tubo interno, se formam microchamas que aumentam a geração de hidrogênio radicalar estabilizando a nuvem atômica ao longo do tubo óptico. Como vantagens da utilização do multiatomizador os autores citam: melhores limites de detecção, aumento da faixa linear de trabalho e um incremento na resistência a interferentes de uma a duas ordens de grandeza, quando comparado o QTA convencional<sup>75,76</sup>.



**Figura 3.** Esquema do multiatomizador de quartzo utilizado para a análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado. Adaptado do original cedido por Jiří Dědina.

Os hidretos gerados podem ser submetidos a dois tratamentos distintos, no que diz respeito ao seu transporte até o atomizador. Nesse sentido, existem duas formas básicas da HG AAS: *(i)* a transferência direta e *(ii)* a pré-concentração. No método de

transferência direta, o hidreto liberado da solução da amostra é transportado diretamente para o atomizador/detector. Já no método de pré-concentração (do inglês “trapping”), o hidreto é aprisionado em um dispositivo de coleta até a finalização do processo de HG e somente depois disso, é liberado e transportado, todo de uma vez, para o atomizador/detector<sup>62</sup>.

O procedimento de pré-concentração foi muito empregado nos anos iniciais da utilização da técnica de HG quando a velocidade de liberação dos hidretos, do meio reacional, era lenta. Com o início do uso do THB como agente redutor, a necessidade de coleta dos hidretos foi reduzida drasticamente e a forma de transferência direta, que é mais simples, passou a ser mais empregada. Atualmente, a pré-concentração é empregada para aumentar a sensibilidade do método ou objetivando a análise de especiação química e é usualmente feita em um coletor criogênico. Esses coletores são normalmente compostos por um tubo em forma de “U”, preenchido ou não com uma fase estacionária, imerso em nitrogênio líquido.

O procedimento de pré-concentração, consiste em duas etapas: (i) coleta e (ii) volatilização/atomização. Na etapa de coleta, os hidretos do analito são transportados do GLS até o coletor, onde são retidos, mas permite a passagem do hidrogênio (gerado na HG) e do gás auxiliar (normalmente He). Na segunda etapa, os hidretos retidos no dispositivo são volatilizados pelo aquecimento do coletor e transportados para a atomização/detecção<sup>62</sup>. Uma variedade de dispositivos de aprisionamento criogênico, para diferentes analitos, incluindo os materiais de preenchimento utilizados e, também, o tipo de dessecadores empregados para remoção do vapor de água e aerossóis da fase gasosa proveniente do separador gás líquido (para evitar o bloqueio do coletor criogênico pelo congelamento da água), já foram descritos<sup>53,77-81</sup>.

A utilização de uma etapa de pré-concentração, como o aprisionamento criogênico (CT), na técnica de HG AAS, além de ter tornado possível a análise de especiação, proporcionou a obtenção de baixos limites de detecção e custo relativamente baixo, vindo a ser uma boa alternativa frente ao alto custo de aquisição e operação dos instrumentos empregados na técnica de HPLC-ICP-MS<sup>6,53,60,63</sup>, até então utilizada para a análise de especiação química de As<sup>3-5,50,54-56</sup>.

#### 2.1.4. Geração de hidretos aplicada à análise de especiação de As

Uma das primeiras citações da utilização do aprisionamento criogênico, como uma etapa de separação das espécies de As, data de 1977 e foi aplicado para análise de amostras ambientais (água de lagos). Nesse trabalho, Braman *et al.*<sup>82</sup> utilizaram a geração de hidretos seguida de um sistema de aprisionamento criogênico, com um tubo em forma de “U”, envolto por uma resistência elétrica, mergulhado em nitrogênio líquido. Na sequência existia um dessecador com hidróxido de sódio e por último o sistema de detecção, composto por uma célula de descarga elétrica. Como fase estacionária no tubo em forma de “U”, foram utilizadas pérolas de vidro. As amostras eram injetadas em uma câmara de reação e na sequência era adicionada uma solução de NaBH<sub>4</sub> 2% (m/v) para a geração das arsinas voláteis. Gás hélio foi injetado no meio reacional e as arsinas liberadas do líquido foram pré-concentradas no sistema de aprisionamento criogênico por 6-8 minutos. Feito isso, o nitrogênio líquido era retirado e o tubo “U” começava a ser aquecido para a volatilização das arsinas retidas de acordo com os seus pontos de ebulição. Para a determinação das espécies trivalentes, as amostras foram tamponadas com biftalato de potássio (pH 3,5). Em um segundo momento, após a geração das arsinas provenientes das espécies trivalentes, as mesmas alíquotas das amostras, foram tamponadas com ácido oxálico (pH 1-1,5) para a determinação das espécies de As pentavalentes. Os autores citam que também foram detectados sinais de MMAs<sup>V</sup>, DMAs<sup>V</sup> e de compostos trimetilados nas amostras. Os limites de detecção relatados foram de 0,2 ng (iAs<sup>III</sup>, iAs<sup>V</sup> e MMAs<sup>V</sup>) e 1 ng (DMAs<sup>V</sup> e TMs<sup>III</sup>).

Em uma publicação no ano de 1997, Howard<sup>68</sup> revisou a utilização do THB em técnicas de especiação de elementos em nível de traço. Nessa revisão são citados três trabalhos<sup>83-85</sup> que utilizam a técnica de geração de hidretos com aprisionamento criogênico e detecção por espectrometria de absorção atômica (HG-CT-AAS) e outros dois<sup>86,87</sup> que, além de utilizar a técnica, citam a utilização do Chromosorb como fase estacionária no tubo “U”.

Um ano mais tarde, Howard e Salou<sup>88</sup> estudaram a utilização de substâncias a base de enxofre (L-cisteína, 2-mercaptoetanol, 2,3-dimercapto-1-propanol, ácido 3-mercapto propiônico, dietilditiocarbamato de sódio, ácido tioglicólico e tioureia) como pré-redutoras na determinação de iAs, MMAs e DMAs com a técnica de HG-CT-AAS. Os reagentes pré-redutores foram adicionados às soluções padrão 20 minutos antes da análise. Os autores relatam que apenas o ácido tioglicólico apresentou resultados

comparáveis aos obtidos com a L-cisteína e as outras substâncias testadas não ocasionaram nenhum aumento no sinal analítico de As, em absorvância, nas condições empregadas. Na sequência, foram feitos estudos com a utilização da L-cisteína e do ácido tioglicólico, com objetivo de verificar o tempo de pré-redução necessário para que as espécies de As atingissem os valores máximos de absorvância. Foi constatado que com a utilização do ácido tioglicólico essa condição era alcançada quase que imediatamente após a sua adição e já, com a L-cisteína, isso apenas ocorreu após 15-20 minutos. Entretanto, os autores concluíram que, além de ambos os reagentes terem sido efetivos na uniformização da sensibilidade das diferentes espécies de As, o uso do ácido tioglicólico não era indicado em virtude de sua toxicidade. Além do mais, com o uso da L-cisteína, menores concentrações de ácido eram requeridas na redução com o  $\text{NaBH}_4$ , o que reduziu os valores dos brancos analíticos, possibilitando a determinação de níveis muito baixos de As<sup>89</sup>.

Um sistema de HG-CT-AAS automatizado para a análise de especiação de As em amostras biológicas (células de carcinoma hepatocelular humano), foi proposto, em 2008, pelo grupo de pesquisa do Prof. Jiří Dědina<sup>53</sup>. A palavra “automatizado” se refere a parte do sistema de aprisionamento criogênico que foi completamente controlado por um acessório de análise de injeção em fluxo (FIAS). No caso de amostras biológicas, a identificação do estado de oxidação das espécies químicas de As (inorgânicas e metiladas) é importante para que se possa entender os mecanismos metabólicos de transformação do As no organismo. As espécies voláteis de As, da amostra, eram produzidas a partir da reação do  $\text{NaBH}_4$  com um tampão Tris-HCl ( $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ ) com pH 6 e eram aprisionadas em um tubo em forma de “U” preenchido com Chromosorb, imerso em nitrogênio líquido. Posteriormente, as arsinas eram volatilizadas, de acordo com seus respectivos pontos de ebulição e/ou propriedades cromatográficas da fase estacionária, pelo aquecimento gradual através de uma resistência elétrica envolta no tubo “U”. Na sequência, as espécies foram atomizadas em um multiatomizador, que já foi descrito anteriormente e detectadas por AAS. Os autores enfatizam que o procedimento proposto requer uma mínima etapa de preparo de amostra, ao menos para as amostras utilizadas, quando comparado com as técnicas acopladas, que envolvem a utilização de uma separação cromatográfica (LC, HPLC, AEC e IC) e detecção por ICP-MS<sup>3-5,50,54-56</sup>.

Além da proposição desse sistema automatizado, os autores focaram os estudos na análise de especiação seletiva de As, para que fosse possível identificar, também, o estado de oxidação das espécies de As que estavam presentes na amostra. O procedimento

foi o mesmo descrito na seção 2.1.3 para a geração seletiva com a utilização de um pré-reduzidor. Os autores destacaram, a necessidade do emprego do multiatomizador e a utilização da correção de fundo com deutério para eliminar uma interferência que foi somente observada com a utilização da L-cisteína. Com o uso da L-cisteína-HCl, as espécies de As (com exceção do  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ ) apresentaram a mesma sensibilidade o que possibilitou que a curva de calibração fosse construída com apenas uma das espécies de As. Os limites de detecção instrumentais foram 0,18 ng e 0,6 ng para iAs e espécies metiladas, respectivamente<sup>53,73</sup>.

No mesmo ano, Hernández-Zavala *et al.*<sup>90</sup> em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Jiří Dědina, aplicaram o sistema automatizado de HG-CT-AAS<sup>53</sup> com multiatomizador, na determinação das espécies de iAs, MMAs e DMAs (III e V) em tecidos biológicos (células da bexiga), células cultivadas na presença de  $\text{iAs}^{\text{III}}$  e em partes dissecadas de ratos que foram submetidos à ingestão de água com  $\text{iAs}^{\text{III}}$ . As amostras foram homogeneizadas em água e digeridas com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 mol L<sup>-1</sup> por toda uma noite, após esse procedimento as amostras foram neutralizadas com hidróxido de sódio. A HG foi realizada com a utilização de  $\text{NaBH}_4$  1% (m/v) com NaOH 0,02% (m/v) e Tris-HCl 0,75 mol L<sup>-1</sup> com pH 6 (no canal do ácido). Após a geração, as arsinas foram transportadas para o sistema de aprisionamento criogênico com auxílio de uma mistura He e H<sub>2</sub> com vazões de 76 e 15 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Nos animais submetidos a ingestão de água com  $\text{iAs}^{\text{III}}$  na água, foi observado no fígado, em comparação com o músculo, a maior concentração de As, a qual estava na forma de DMAs. Os autores relataram LODs instrumentais de 9-20 pg para as espécies trivalentes e de 8-20 pg para as espécies pentavalentes. As recuperações de As ficaram entre 78-117%.

Em outro estudo, Currier *et al.*<sup>91</sup> reportaram a utilização do sistema de HG-CT-AAS<sup>53</sup> automatizado na análise de espécies metiladas tri- e pentavalentes de As, com o uso de pré-redução e o tampão de Tris-HCl 0,75 mol L<sup>-1</sup> na HG, conforme proposto anteriormente<sup>53</sup>. Para o preparo das suspensões da amostra ou homogeneizados da amostra (termo utilizado pelos autores), foi utilizado um sistema de homogeneização construído pelos próprios pesquisadores. O sistema era composto por uma haste metálica com uma estrutura de teflon em uma das pontas. A outra ponta era fixada em uma furadeira doméstica de mão e a haste era inserida em um frasco de vidro do tipo “tubo de ensaio” onde estava uma pequena porção da amostra. A furadeira era então acionada e a estrutura de teflon começava a girar e a homogeneização ocorria pelo atrito da amostra, que ficava entre o teflon e a parede de vidro. Para evitar possíveis mudanças no estado de

oxidação das espécies de As, pela elevação de temperatura da amostra ocasionada pelo atrito durante o processo, o frasco de vidro era mantido em um banho com gelo. Os autores focaram a discussão dos resultados nas espécies metiladas trivalentes por serem metabólitos de As, após a exposição dos organismos ao  $iAs^{III}$ . Como conclusão, foi relatado que 66% do As determinado no fígado do rato exposto ao  $iAs^{III}$  continuou na forma trivalente, dos quais aproximadamente 12% estavam na forma de  $MMAs^{III}$  e 45% como  $DMAs^{III}$ .

Como um novo avanço da técnica de HG-CT-AAS, recentemente, Svoboda *et al.*<sup>92</sup> propuseram a miniaturização do sistema de aprisionamento criogênico. Os autores utilizaram o termo “capilar em forma de U” para se referirem ao novo sistema de aprisionamento criogênico. O sistema foi construído com um capilar de sílica fundida não-polar coberto com poliamida (20 cm, 0,53/0,65 mm de d.i./d.e., respectivamente) sendo que 90% do seu comprimento (18 cm) ficava dentro de um tubo PTFE (0,75/1,56 mm de d.i./d.e., respectivamente) para proteger o capilar de danos mecânicos e danos causado por alta pressão. Aproximadamente, 1/3 do comprimento do sistema ficava imerso em nitrogênio líquido para a coleta das arsinas e na etapa de volatilização não foi utilizado nenhum aquecimento, o capilar apenas foi retirado do nitrogênio líquido e exposto à temperatura ambiente. Foi necessário a utilização de um dessecador de NaOH, posicionado entre o GLS e o capilar, para remover os aerossóis e vapor de água provenientes do GLS. Os autores observaram que, ao contrário da HG-CT-AAS, não foi necessário o uso da correção de fundo com deutério. Foi concluído que o sistema miniaturizado proposto demonstrou o mesmo desempenho obtido com o tubo em forma de “U” convencional utilizado na HG-CT-AAS.

Após uma intensa revisão da literatura sobre a HG-CT-AAS, foi constatado que não existem trabalhos que relatam a especiação de As em alimentos infantis com a aplicação dessa técnica. A falta de estudos que explorem a utilização da técnica de HG-CT-AAS, somado ao fato do crescente interesse na especiação química de As em alimentos infantis, reforçam a importância da realização desse trabalho.

#### **2.1.4.1. Preparo de amostra para especiação de As por HG-CT-AAS**

O preparo de amostra é considerado a etapa mais crítica da análise de especiação química de As. Esse preparo deve ser eficiente, garantindo que as espécies de As, contidas na amostra, sejam quantificadas sem que as formas originais das mesmas sejam

comprometidas. Os maiores problemas estão relacionados com as baixas recuperações das espécies de As, oxidação ou redução entre  $iAs^V$  e  $iAs^{III}$  e a conversão das espécies orgânicas de As em  $iAs^{93-95}$ .

Dificuldades significativas são reportadas na determinação quantitativa de  $iAs$  em amostras, como o arroz. Já se sabe que o  $iAs$  está fortemente ligado aos grupos SH encontrados em proteínas do hialoplasma e de componentes macromoleculares desse grão, dessa forma, o uso de condições brandas para o preparo desse tipo de amostra pode não ser eficiente na determinação de  $iAs$ . Por outro lado, as formas orgânicas de As, como o DMAs, não estão ligadas quimicamente à grandes estruturas presentes no grão e, portanto, dependem menos do método de preparo de amostra empregado<sup>59,95,96</sup>.

No entanto, etapas de pré-tratamento da amostra que objetivam sua dissolução/decomposição, além de aumentarem o tempo de realização da análise, podem causar a conversão das espécies de As contidas na amostra. Frente a isso, o uso da amostra na forma de suspensão, com a utilização da técnica de HG acoplada à AAS (que também pode ser aplicada à HG-CT-AAS), surge como uma boa alternativa para contornar esses problemas, pois evita a digestão da amostra por métodos de oxidação úmida ou a seco<sup>97</sup>.

O preparo da amostra na forma de suspensão começou a ser utilizado em 1974 por Brady *et al.*<sup>98,99</sup> e ainda continua sendo empregado até os dias atuais. O uso de suspensões permitiu combinar as vantagens significantes dos métodos de amostragem sólida (redução do tempo de preparo de amostra, diminuição do risco de contaminação da amostra) e líquida (injeção da amostra com o uso das abordagens convencionais da amostragem líquida, flexibilidade no preparo da suspensão). Além do mais, a curva de calibração pode ser construída, em muitos casos, com soluções padrão aquosas. A utilização desse método de introdução direta da amostra permite a utilização de várias replicatas a partir do preparo de apenas uma suspensão. Dessa forma, a amostragem direta por suspensão surge como uma ótima alternativa para a análise de especiação, já que condições brandas de preparo de amostra são mandatórias para evitar a conversão das espécies químicas originais de As contidas na amostra<sup>2,8,60,100</sup>.

O fator mais crítico, que deve ser levado em consideração, é que a suspensão deve se manter estável durante todo o procedimento analítico para garantir uma boa reprodutibilidade da análise, sendo assim, a etapa de preparo da suspensão é de grande importância. Muitas vezes é necessário o emprego de estabilizantes e procedimentos como aquecimento e/ou agitação ultrassônica, que auxiliem na estabilização da mesma, garantindo assim a representatividade da amostra. O pré-tratamento da suspensão com

soluções diluídas de reagentes ácidos ou alcalinos, também, é uma boa alternativa, pois a solução, além de ser utilizada como meio líquido para formação da suspensão, age na extração do analito de interesse para a fase líquida. O uso de um reagente diluído no preparo da suspensão, pode facilitar a entrada do agente redutor nas partículas da amostra durante a HG, auxiliando a formação dos hidretos voláteis do analito. Não se pode afirmar como o agente redutor que penetra nas partículas sólidas da suspensão reage com o analito, mas uma possível explicação é de que o analito contido nessas partículas também é transformado em hidreto volátil<sup>8,60,101</sup>.

A agitação ultrassônica é uma ferramenta que pode ser empregada para auxiliar o preparo da amostra na forma de suspensão e, quando combinado com aquecimento, o ultrassom promove um aumento da solubilidade e difusividade. Como principais vantagens, do uso da agitação ultrassônica no preparo de suspensões, podem-se citar o baixo custo e a diminuição do tempo de preparo da amostra e a facilidade de utilização do sistema, que na maioria das vezes é empregado na forma de um banho ultrassônico. A energia ultrassônica promove uma agitação efetiva que contribui para a homogeneidade da suspensão da amostra. Como vantagens adicionais frente aos métodos tradicionais de preparo de suspensões, como agitação magnética ou misturadores do tipo *vortex*, pode-se citar o aumento da liberação do analito para a fase líquida, causada pela ação da energia ultrassônica combinado com o uso de um reagente químico<sup>102</sup>.

Na literatura não existem trabalhos que citem o emprego da amostragem direta na forma de suspensão para a especiação de As em alimentos infantis, com o uso da técnica de HG-CT-AAS ou HPLC-ICP-MS. Esse fato, junto com a necessidade de redução do preparo de amostra para que a integridade das espécies químicas de As possam ser mantidas, corroboram ainda mais para o desenvolvimento deste trabalho.



## 2.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA

### 2.2.1. Petróleo e óleo diesel

Na metade dos anos 1950 o petróleo se tornou a mais importante fonte mundial de energia, devido ao seu alto valor energético, facilidade de transporte e abundância. Antes de sua exploração, estimava-se que existiam reservas de 2,3 trilhões de barris de petróleo e atualmente essas reservas foram confirmadas em 1,8 trilhões de barris. O consumo mundial em 2014 atingiu a marca de 25,387 bilhões de barris, dos quais 890,220 milhões de barris foram consumidos apenas no Brasil<sup>103-105</sup>.

O petróleo é uma mistura complexa de inúmeros compostos orgânicos, com predominância, de hidrocarbonetos. Sua composição química varia de acordo com a sua procedência e além dos hidrocarbonetos, são encontrados em pequena quantidade compostos nitrogenados, sulfurados, oxigenados, e ainda alguns compostos contendo metais em sua molécula, como níquel, vanádio, cobre e ferro<sup>106</sup>.

Do volume de hidrocarbonetos presentes no petróleo, 84% são convertidos em combustíveis altamente energéticos (combustíveis derivados do petróleo), incluindo gasolina, gasolina de aviação, gás liquefeito de petróleo, óleo diesel e outros óleos combustíveis. Os 16% restantes são usados como matéria-prima para muitos produtos químicos, incluindo fármacos, solventes, fertilizantes, pesticidas, e plásticos<sup>103,106</sup>.

Dentre os combustíveis citados, o óleo diesel merece um destaque especial por ser o derivado propulsor do refino devido ao seu alto consumo no nosso país. Em 2014, o óleo diesel representou 45,2% do total de derivados de petróleo produzidos, indicando um aumento de 2,3% no consumo desse combustível, quando comparado ao ano anterior, passando de 48,797 tep (tonelada equivalente de petróleo) para 49,935 tep<sup>105</sup>.

Quimicamente, o óleo diesel é uma combinação complexa de hidrocarbonetos, produzido pela destilação do óleo cru, com número de carbonos, predominantemente, na faixa de C<sub>8</sub> – C<sub>18</sub> e ponto de ebulição entre 126-258 °C. Dentre sua composição, pode-se citar compostos parafínicos, naftênicos, aromáticos e cicloalcanos aromáticos de cadeia normal e ramificada. Em baixas concentrações são encontrados compostos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e niquelados, devido à presença no óleo cru, e ainda cobre, ferro e zinco, provenientes do processo de produção e estocagem<sup>9,107,108</sup>.

### 2.2.2. Enxofre no óleo diesel e a problemática ambiental

No que tange à problemática ambiental, os óxidos de enxofre ( $\text{SO}_x$ ) formados durante a combustão do óleo diesel, no interior da câmara de combustão dos motores, são descarregados para a atmosfera onde, em contato com vapor de água, se transformam em ácido sulfuroso e sulfúrico que precipitam na forma de chuva ácida. Essa precipitação é muito nociva ao meio ambiente, pois causa danos à vida aquática por diminuição do pH da água e aos solos no qual interfere na solubilidade de alguns compostos indispensáveis ao desenvolvimento vegetal, podendo alterar o metabolismo das plantas, o que tende a ocasionar uma depreciação em sua taxa de crescimento<sup>11</sup>.

O dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), além de estar envolvido no processo de formação da chuva ácida, contribui também para o efeito estufa. Além disso, o  $\text{SO}_2$  presente na atmosfera pode se transformar em sulfato, que é um dos principais componentes da classe de poluentes atmosféricos denominada partículas inaláveis (MP10 – o numeral indica que as partículas possuem diâmetro  $<10 \mu\text{m}$ ) e podem causar diversos problemas ao sistema respiratório da população<sup>11</sup>.

Frente a esses problemas, surge a necessidade de emissões cada vez mais limpas, que só poderão ser atingidas com a utilização de combustíveis com teores de enxofre cada vez menores e para que isso ocorra, surge a necessidade de processos mais eficazes de remoção. Com intuito de alcançar este requisito, a indústria petrolífera vem desenvolvendo processos de dessulfurização de modo a obter o que chamam de óleo diesel com concentração de enxofre ultrabaixa (ULSD)<sup>109,110</sup>. Em países da Comunidade Europeia, o limite da concentração de enxofre no óleo diesel é igual a 0,001% (m/m), representando uma diminuição de duas ordens de grandeza (0,050% m/m em 1996) ao longo de 13 anos<sup>111</sup>.

No Brasil, através da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a exigência de teores de enxofre cada vez mais baixos nos combustíveis pode ser claramente observada em uma busca rápida na legislação pertinente. Nos anos 50, era permitida uma concentração máxima de enxofre de 10.000 mg  $\text{kg}^{-1}$  no óleo diesel e gasolina<sup>112</sup>, já em meados dos anos 2000 o valor caiu para 2.000 mg  $\text{kg}^{-1}$ , para a frota metropolitana e 3.500 mg  $\text{kg}^{-1}$  para os veículos interioranos<sup>113</sup>. Foi em 2011 que o mercado brasileiro passou a comercializar óleo diesel com teor máximo de 10 mg  $\text{kg}^{-1}$  de enxofre nas regiões metropolitanas<sup>114</sup>, mas foi somente com a publicação da Resolução ANP n° 50, de 23/12/2013, que ficou estabelecida a oferta de

óleo diesel com teor máximo de enxofre de 10 mg kg<sup>-1</sup> (S10) em todo o território brasileiro. A legislação determinou ainda, que os veículos com motores diesel das fases L-6 (leves) e P-7 (pesados) do Programa de Controle de Poluição do Ar por Veículos (PROCONVE), promovido pelo Ministério do Meio Ambiente, somente poderiam utilizar o óleo diesel S10<sup>12</sup>.

### 2.2.3. Equipamentos e técnicas analíticas utilizadas para determinação de enxofre

A determinação de enxofre em diferentes amostras tem sido reportada na literatura por meio da utilização de várias técnicas analíticas. É relatada a utilização de técnicas não espectrométricas como a gravimetria<sup>115,116</sup>, voltametria de onda quadrada<sup>117</sup>, volumetria<sup>118</sup>, cromatografia iônica<sup>119,120</sup> e a cromatografia gasosa<sup>121-123</sup>. Já o uso de técnicas espectrométricas para a determinação de enxofre inclui a fluorescência de raios-X (XRF)<sup>124</sup>, espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis)<sup>125,126</sup>, espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)<sup>127-129</sup>, espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)<sup>130,131,132</sup> e a espectrometria de absorção atômica (AAS)<sup>1,133</sup>.

Como métodos padrão para determinação de enxofre em óleo diesel no Brasil, a ANP<sup>12</sup> determina que sejam utilizados os publicados pela Associação Nacional de Normas Técnicas (ABNT) por meio das Normas Brasileiras (NBR)<sup>134</sup> e pela Sociedade Americana de Testagem de Materiais (ASTM)<sup>13-18</sup>. As técnicas analíticas empregadas nesses métodos baseiam-se na fluorescência de raios-X por dispersão de energia (ED-XRF)<sup>15,134</sup>, fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WD-XRF)<sup>16,17</sup> e na fluorescência induzida por UV (UVIF)<sup>18</sup>.

Os métodos indicados, com utilização da técnica de XRF, necessitam a utilização de equipamentos onerosos, quando comparados aos espectrômetros de absorção atômica. O outro método indicado, que utiliza a UVIF, necessita de um equipamento especial<sup>19</sup> exclusivo para esse tipo de análise em amostras compostas por hidrocarbonetos, que acaba sendo justificável apenas para laboratórios que analisam um grande número de amostras. Nesse sentido, a utilização da técnica de AAS, para a determinação de enxofre, surge como uma alternativa pela sua simplicidade e baixo custo.

Nesta parte do trabalho, será investigado o desenvolvimento de um método para determinação indireta de enxofre em óleo diesel utilizando a técnica de HR-CS GF MAS, com foco na utilização de modificadores químicos e em um mínimo preparo de amostra.

Como foi apresentado anteriormente<sup>20</sup>, mesmo que já existam métodos desenvolvidos para este fim, ainda existem muitas possibilidades a serem estudadas utilizando essa nova abordagem da AAS.

### **2.2.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica com Fonte de Linha (LS AAS)**

Em virtude de as linhas analíticas do enxofre estarem situadas na região do baixo ultravioleta (180,7, 182,0 e 182,6 nm), o elemento não pode ser determinado diretamente por AAS nos equipamentos comerciais disponíveis, devido aos problemas decorrentes do aumento do ruído provocado pela absorção das radiações com comprimento de onda menores que 200 nm, pelo oxigênio atmosférico<sup>135</sup>.

Mesmo sabendo dessas limitações, alguns esforços, que remontam à década de 70, foram feitos por Kirkbright *et al.*<sup>136</sup>, para determinar enxofre diretamente com a técnica de espectrometria de absorção atômica na chama (F AAS). Os autores descrevem o uso de um espectrômetro de absorção atômica modificado, com monocromador a vácuo e a utilização de uma chama de óxido nitroso-acetileno protegida por um sistema de “blindagem” por gás nitrogênio. O experimento foi realizado com padrões de sulfato de potássio e tiourea e as medidas foram feitas no comprimento de onda de 180,7 nm. Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL), contendo 1 mg de enxofre sublimado. Os melhores resultados foram encontrados com o uso do padrão de tiourea em solução alcoólica, quando foi relatada uma concentração característica de 4,4 mg L<sup>-1</sup> e um limite de detecção (LOD) de 12 mg L<sup>-1</sup>. Como pontos negativos, foram citados, o problema de auto-absorção da EDL, mesmo operando em baixa potência, a utilização de um fotomultiplicador pouco eficiente e a dificuldade de manter o vácuo no monocromador.

A indisponibilidade comercial dos equipamentos modificados, fez com que a determinação indireta de enxofre fosse uma alternativa a ser explorada nos espectrômetros de absorção atômica comerciais da época. Nesse sentido, pode-se citar o uso de técnicas de digestão que eram aplicadas para conversão do enxofre, presente nas amostras, em sulfato e posterior precipitação do mesmo como sulfato de bário. O sal precipitado era dissolvido com uma solução de ácido etilenodiamino tetra-acético e o bário (Ba) determinado por FAAS<sup>137-139</sup>. É importante lembrar, que os procedimentos de decomposição e tratamento de amostra, normalmente são morosos e acarretam em erros sistemáticos devido à conversão incompleta do analito.

Em virtude dos problemas relatados, na determinação direta de enxofre em espectrômetros de absorção atômica modificados e dos procedimentos de preparo de amostra necessários para a determinação indireta de enxofre, ambos não foram difundidos.

### 2.2.3.2. *Espectrometria de Absorção Molecular com Fonte de Linha (LS MAS)*

A espectrometria de absorção molecular (MAS) foi proposta nos anos 70 com intuito de permitir a determinação de não-metals, dentre eles o enxofre, com a utilização dos espectrômetros de absorção atômica com fonte de linha de baixa resolução, disponíveis na época. A técnica baseava-se no monitoramento da absorvância de uma molécula diatômica formada, a altas temperaturas, pelo analito e outro elemento. Como fonte de radiação eram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (HCL) elementares que emitiam energia radiante em comprimentos de onda coincidentes com os espectros de absorção das moléculas diatômicas<sup>140,141-143</sup>.

Tittarelli *et al.*<sup>144</sup> analisando óleo cru, registraram espectros de diferentes espécies de enxofre em forno de grafite um espectrômetro com arranjo de diodos como detector. Dois anos mais tarde, Tittarelli e Lavorato<sup>145</sup>, analisando óleos combustíveis, investigaram a determinação de enxofre a partir das bandas de absorção da molécula diatômica de sulfeto de carbono (CS). Para tanto, foi usada como fonte de radiação uma HCL de Fe (257,6 nm) e a correção de fundo foi feita com lâmpada de deutério. Os autores relatam ter encontrado um LOD de 50 mg kg<sup>-1</sup>.

Foi somente sete anos após o trabalho de Tittarelli e Lavorato<sup>145</sup>, em 1994, que houve outra publicação sobre a determinação de enxofre por LS GF MAS. Nela, Parvinen e Lajunen<sup>146</sup> estudaram a determinação de enxofre via absorção das moléculas diatômicas de SnS, AlS e InS. Nos experimentos com AlS os autores utilizaram HCL de Fe (219,18 nm), Cu (219,23 nm) e W (219,21 e 219,45 nm) por saber que as mesmas possuíam linhas de emissão próximas às de absorção da molécula alvo. Para a molécula de InS foram utilizadas HCL de Pt, W e Fe e por último, com a molécula de SnS, foram utilizadas HCL de Mo, Cr, Fe e W. Após a otimização, o método foi aplicado em uma amostra de ácido tiosalicílico, para determinação de enxofre via molécula de SnS, com uma HCL de Pt utilizando o comprimento de onda de 243,67 nm. O teor de enxofre obtido pelo método proposto ficou de acordo com o teor teórico de enxofre na amostra.

A técnica de LS MAS não teve uma boa aceitação em virtude das limitações dos espectrômetros convencionais de LS AAS. O monocromador, disponível na época, que era utilizado nos espectrômetros possuía baixa resolução para separar linhas adjacentes muito estreitas dos espectros de rotação das moléculas e outro problema, era o sistema de correção de fundo ineficiente<sup>140</sup>.

### 2.2.3.3. O Espectrômetro de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua

O espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua foi descrito pelo grupo de Becker-Ross<sup>147,148</sup> no ano de 1996, mas o primeiro instrumento comercial desse tipo, usando um atomizador com chama foi introduzido no mercado somente em 2004. Um segundo modelo dotado com forno de grafite e chama, denominado contrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) foi lançado dois anos mais tarde.

Nesses equipamentos foi usada uma lâmpada de arco curto de xenônio, operando em modo *hot-spot*, que emite uma radiação contínua de alta intensidade tornando disponível, para medidas de absorção, todos os comprimentos de onda situados entre 190 e 900 nm. A alta resolução foi uma das maiores vantagens desses novos equipamentos, sendo provida pelo uso de um monocromador compacto de alta resolução composto por um prisma, para a pré-dispersão da radiação incidente e por uma rede de difração *echelle*, que fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado. A resolução alcançada é de aproximadamente 1,5 pm por *pixel* (unidade fotossensível do detector) a 200 nm. O sistema de detecção é composto por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) com 588 *pixels*, sendo que cada *pixel* atua como um detector independente, entretanto, somente 200 *pixels* são utilizados com propósitos analíticos<sup>140,149</sup>.

A utilização do CCD inseriu o comprimento de onda como uma terceira dimensão à medida do sinal de absorvância pelo tempo. Dessa forma, com a linha analítica de interesse posicionada no centro desse novo eixo composto por um total de 200 *pixels*, foi possível visualizar uma pequena faixa do espectro ao redor do comprimento de onda selecionado. Com o fato de cada *pixel* fazer sua própria medida e cálculo da absorvância ou absorvância integrada ( $A_{int}$ ), estes valores medidos podem ser somados sem afetar a linearidade da curva de calibração. Nesse caso, por exemplo, pode-se utilizar os *pixels* laterais à linha analítica, ou no caso de multipletes, mais de uma linha analítica pode ser monitorada para aumentar a sensibilidade<sup>140</sup>.

Uma outra vantagem que se teve com a utilização do equipamento, é um maior potencial para correção da absorção de fundo, pela possibilidade de se monitorar a vizinhança espectral das linhas analíticas, facilitando, dessa forma, a detecção de possíveis interferências em tempo real e a correção de rápidas mudanças contínuas na absorção de fundo. Esse monitoramento é realizado simultaneamente com a linha analítica selecionada. No caso de interferências que não podem ser resolvidas no tempo (por otimização do programa de temperatura combinado com o uso de modificadores químicos) existe a opção de se utilizar uma correção matemática através do algoritmo de mínimos quadrados, no qual é possível gerar um espectro de referência da interferência e subtraí-lo do espectro de interesse<sup>140,149</sup>.

#### **2.2.3.4. Espectrometria de Absorção Molecular de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS MAS)**

O advento dos espectrômetros de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua abriu uma perspectiva completamente nova para a MAS em elevadas temperaturas, pois foi possível superar as limitações que haviam sido impostas à técnica com o uso dos espectrômetros convencionais de LS AAS. Com a alta resolução dos novos equipamentos foi possível resolver as estruturas finas rotacionais do espectro das moléculas diatômicas e o uso da fonte contínua de radiação de alta intensidade, tornou acessível qualquer comprimento de onda na faixa de 190 a 900 nm. A utilização do CCD tornou possível, o monitoramento do sinal de absorvância de uma ou mais linhas rotacionais e, além disso, o uso dos *pixels* situados nos “vales” (entre as estruturas finas rotacionais) poderiam ser usados para uma efetiva correção da absorção de fundo<sup>140</sup>. E foi em pouco tempo, após a disponibilização comercial desse novo espectrômetro, que vários trabalhos com MAS começaram a ser publicados para a determinação de S e outros elementos.

Huang *et al.*<sup>150</sup> estudaram a determinação de enxofre total em vinho através da absorção molecular do monossulfeto de carbono (CS) em uma chama de ar-acetileno. Um ano após essa publicação, o mesmo grupo, fez um estudo mais aprofundado sobre as possibilidades de determinação de enxofre<sup>151</sup>. Para tanto, eles mediram a absorção molecular do CS em uma faixa de 200 a 400 nm e verificaram que as absorções máximas ocorreram em torno de 258 nm. Em outro trabalho, Huang *et al.*<sup>152</sup>, estudaram a viabilidade da especiação de enxofre (SO<sub>2</sub> livre, SO<sub>2</sub> ligado, SO<sub>2</sub> total e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), via CS,

em amostras de vinho. Como conclusão, os pesquisadores relataram altos desvios padrão nas medidas do SO<sub>2</sub> livre, devido à sua baixa concentração no vinho, mas citaram a determinação do SO<sub>2</sub> total como satisfatória, com um LOD de 1,8 mg L<sup>-1</sup>.

Baysal e Akman<sup>153</sup>, utilizando HR-CS FMAS, determinaram enxofre, como molécula de CS, em amostras de carvão após digestão em forno de micro-ondas. O comprimento de onda de 258,056 nm foi definido como o mais adequado com relação à sensibilidade. Os autores encontraram LOD e LOQ de 0,01 e 0,03% (m/m), respectivamente. Utilizando a mesma técnica, Virgílio *et al.*<sup>154</sup> investigaram a determinação de enxofre, através da absorção da molécula de CS e SH em amostras agrícolas (fungicidas e fertilizantes sulfatados), após digestão em forno de micro-ondas. Na etapa de escolha do comprimento de onda os autores excluíram a utilização da molécula de SH em virtude da baixa precisão obtida nas medidas.

A determinação de enxofre, por HR-CS MAS com forno de grafite (HR-CS GF MAS) usando a absorção molecular do CS foi estudada por Heitmann *et al.*<sup>155</sup>. As determinações foram feitas em amostras de folhas de espinafre e pêsego após digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. No sentido de garantir uma efetiva formação da molécula alvo, o tubo de grafite foi recoberto com 80 µg de zircônio antes de cada medida e um suplemento de carbono, na forma de gás metano (4%), foi inserido no forno durante a etapa de pirólise. Além disso, foi usado cálcio como modificador em solução, possibilitando que a temperatura de pirólise fosse aumentada de 250 °C para 700 °C. Os autores encontraram, para o método proposto, uma massa característica de 12 ng e um LOD de 2,3 ng, mas em uma das amostras, o resultado obtido não ficou de acordo com o teor certificado. Como o motivo dessa discrepância não ficou claro, a determinação foi repetida por HR-CS FMAS e o resultado obtido ficou de acordo com o encontrado anteriormente com a utilização do forno de grafite.

A determinação de enxofre, como molécula de CS, em materiais biológicos usando HR-CS SS-GF MAS foi estudada por Ferreira *et al.*<sup>156</sup>. Os autores relataram que os melhores resultados foram obtidos quando a plataforma utilizada foi recoberta com tungstênio, como modificador permanente, e mais 40 µg de Pd, como modificador em solução. Primeiramente foi relatado o uso do comprimento de onda de 258,056 nm, que possui a maior sensibilidade para determinação de S, como CS, mas em virtude do aparecimento de uma interferência espectral, ocasionada pelo alto teor de ferro das amostras, as medidas foram feitas na linha analítica de 258,033 nm. A substância com enxofre na molécula, que mostrou melhores resultados em sensibilidade e estabilidade



térmica, para fins de calibração foi a tiourea ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CS). O LOD obtido, sob condições otimizadas, foi de 0,015 µg absoluto ou 0,03 mg g<sup>-1</sup> de S na amostra sólida.

Resano e Flórez<sup>157</sup>, também utilizando amostragem sólida, estudaram a viabilidade de determinar enxofre, como CS, em diferentes matrizes sólidas (polietileno, aço, coque de petróleo e biológicas). Os autores tiveram bons resultados com a utilização de 40 µg de Pd na forma de uma dispersão de nanopartículas em conjunto com a utilização de 400 µg de Ru, como modificador permanente. Os autores utilizaram o comprimento de onda de 257,958 nm em virtude da mesma interferência espectral relatada por Ferreira *et al.*<sup>156</sup>. A precisão obtida no método proposto, foi de 5-10% em desvio padrão relativo, com uma massa característica de 14 ng e um LOD absoluto de 3 ng. Também foi relatado que, quando o sinal analisado incluiu o monitoramento de seis linhas analíticas disponíveis na janela espectral, para o CS, o desvio padrão relativo caiu para 3-5% e a massa característica e o LOD absoluto foram reduzidos para 3 ng.

Mior *et al.*<sup>10</sup>, desenvolveram um método para determinação de enxofre, como CS, em carvão. Sabendo que o carvão pode conter concentrações relativamente altas de ferro e levando em consideração a interferência espectral desse elemento em 258,056 nm, reportada por Ferreira *et al.*<sup>156</sup>, os autores selecionaram o comprimento de onda de 258,033 nm para as medidas. O modificador permanente selecionado foi o Ru por ter sido observada uma maior sensibilidade, quando o mesmo foi utilizado. A L-cisteína foi escolhida como padrão de enxofre. Para verificação da exatidão do método, foram utilizados três materiais de referência certificados (CRMs) e os resultados encontrados ficaram de acordo com o valor certificado. Foi relatado um LOD melhor que 0,1 µg de S para o método desenvolvido.

Em outro trabalho, Baumbach e Einax<sup>158</sup>, relatam o desenvolvimento de um método para determinação de enxofre em carvão, como SnS, em carvão por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite com amostragem direta de sólidos (HR-CS SS-GF MAS). Os autores investigaram a utilização de vários elementos como modificadores químicos e os melhores resultados foram obtidos com o uso de Pd em forno recoberto com Ir. Foi relatada uma precisão de 1-6% (RSD), para o método, que é coerente para a amostragem direta de sólidos. A exatidão do método foi verificada com materiais de referência certificados com diferentes teores de enxofre e os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados. O LOD absoluto calculado foi de 10 ng.

Em um trabalho recente, Cadorim *et al.*<sup>159</sup> reportaram o desenvolvimento de um método para determinação de enxofre, como SnS, em óleo cru por HR-CS GF MAS usando o comprimento de onda de 271,624 nm. As amostras foram preparadas na forma de micro-emulsões, devido à alta viscosidade do óleo cru. Foram investigados o uso de Ir, Zr, Pd e Ru, como modificadores permanentes e o Pd foi escolhido por apresentar os maiores valores de absorvância integrada. A exatidão do método foi verificada com o uso de dois materiais de referência certificados e as concentrações de enxofre obtidas ficaram de acordo com o teor certificado. O LOD absoluto e a massa característica foram de 5,8 e 13,3 ng de enxofre, respectivamente.

É importante lembrar duas condições analíticas que devem ser consideradas para que sejam alcançados bons resultados na determinação de enxofre com a MAS em forno de grafite (GF MAS). A primeira é a estabilização do enxofre com o uso de um modificador químico apropriado que permita o uso de altas temperaturas de pirólise para remover a matriz da amostra e destruir as moléculas sulfuradas originais, sem a perda do analito e a segunda condição é garantir a formação da molécula alvo, para que seja obtido o máximo de sensibilidade<sup>10</sup>. Entretanto, isso pode ser uma tarefa difícil usando derivados de petróleo como amostra<sup>21</sup>. Para a determinação de enxofre, como CS, em derivados do petróleo com vaporização em forno de grafite (HR-CS GF MAS), Kowalewska<sup>21</sup> enfatizou a importância da utilização de Pd/Mg como modificador químico para uniformizar o comportamento dos diferentes compostos de enxofre presentes nesses produtos, prevenindo assim a perda de enxofre durante as etapas de secagem e pirólise. A autora investigou o uso de Pd e Mg na forma orgânica, junto e separadamente, como modificadores em solução e a combinação deles com tungstênio e zircônio, como modificadores permanentes. Com a utilização do tungstênio, não foi observada nenhuma melhora nas curvas de pirólise (comparado com o tubo padrão recoberto com grafite pirolítico) e com zircônio resultados não precisos foram observados. Portanto, os modificadores permanentes testados não foram utilizados pela autora, foi utilizada apenas a mistura de Pd/Mg, na forma orgânica, como modificador químico. Usando essa mistura de modificadores, a autora não observou um patamar na curva de pirólise e a temperatura de 400 °C foi selecionada. Os resultados obtidos foram satisfatórios apenas para alguns produtos pesados, derivados do petróleo, utilizando CRMs como padrões para a calibração. Para derivados do petróleo relativamente voláteis, como óleos leves, os resultados ficaram abaixo do valor real devido à perda de compostos sulfurados voláteis ocorrida nas etapas precedentes à vaporização. Por outro lado, não foi possível aumentar

a concentração de Pd ou aumentar o volume de modificador, objetivando a estabilização do enxofre, devido à baixa solubilidade do modificador na forma orgânica em xileno e devido ao espalhamento não efetivo do modificador químico diluído após a injeção no forno de grafite.

Recentemente, Nakadi *et al.*<sup>20</sup> reportaram o uso de nanopartículas de paládio como modificador químico na determinação de enxofre em amostras de óleo diesel por HR-CS GF MAS, utilizando a análise direta e a amostra na forma de emulsão alcoólica. Os autores investigaram diferentes modificadores químicos: solução de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, nanopartículas de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, nanopartículas de PdCl<sub>2</sub> e rutênio em solução em conjunto com as nanopartículas de paládio (feitas a partir do Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Utilizando estes diferentes modificadores químicos os autores observaram uma queda acentuada no sinal de absorvância entre as temperaturas situadas entre 300 e 600 °C, indicando que ainda existiam perdas de enxofre, mesmo quando baixas temperaturas de pirólise eram aplicadas. Os autores analisaram amostras de óleo diesel S1800, S500 e S10 coletados em postos de combustíveis da cidade de Ribeirão Preto – SP e a validação do método foi feita com a utilização de duas amostras com teores de enxofre conhecido. As concentrações de enxofre obtidas pelo método proposto ficaram de acordo com os valores de referência.

Além do uso de modificadores químicos, quando se está trabalhando com combustíveis, como o diesel, é normalmente necessário algum tipo de preparo de amostra, devido a sua alta viscosidade, para garantir a representatividade, bem como a reprodutibilidade durante a análise. Essas condições podem ser alcançadas com o uso de uma solução de três componentes, micro-emulsões, ou com a diluição com algum tipo de solvente. Korn *et al.*<sup>99</sup>, em uma revisão da literatura, citou a utilização de xileno, isobutilmetil-cetona, octano, 2-propanol e tolueno para a diluição de combustíveis. Nakadi *et al.*<sup>20</sup> empregaram com sucesso o uso de uma emulsão alcoólica no preparo de amostra para determinação de enxofre em amostras de óleo diesel. O uso da emulsão alcoólica favoreceu a miscibilidade das nanopartículas de Pd, usadas como modificador, com as amostras de óleo diesel. No presente trabalho, é proposto a diluição das amostras de óleo diesel, previamente à análise, com o uso de 1-propanol. É importante ressaltar que até então, o uso de 1-propanol foi reportado apenas como componente de micro-emulsão e não como diluente<sup>160,161</sup>.

### 3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de especiação química de As em alimentos infantis por HG-CT-AAS automatizado e determinação indireta de S em óleo diesel por HR-CS GF MAS, com foco na redução do preparo das amostras. Os objetivos específicos deste trabalho são descritos a seguir:

#### 3.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS ATOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR:

- ⇒ Verificar a sensibilidade do sistema de HG-CT-AAS, para os padrões das espécies químicas de As (iAs, MMAs, DMAs e TMA<sub>5</sub>O) utilizando como base os trabalhos onde a técnica foi aplicada anteriormente;
- ⇒ Estudar o uso de diferentes reagentes, em diferentes concentrações, para o preparo da amostra na forma de suspensão, bem como a utilização de aquecimento e agitação em banho ultrassônico;
- ⇒ Investigar possíveis efeitos de matriz e conversão das espécies químicas de As pelo preparo das amostras na forma de suspensão;
- ⇒ Estudar a viabilidade de utilização de soluções padrão aquosas para a calibração;
- ⇒ Determinar e estabelecer os parâmetros de mérito e verificação da exatidão do método;
- ⇒ Determinar as espécies químicas de As nas suspensões dos alimentos infantis;
- ⇒ Determinar o teor total de As, por ICP-MS, nas amostras, após digestão ácida, para verificar a recuperação de As obtido com a análise de especiação.

### **3.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA:**

- ⇒ Otimizar o método analítico para garantir a efetiva formação da molécula alvo investigando a utilização de diferentes moléculas e linhas analíticas reportadas na literatura;
- ⇒ Investigar a possibilidade do emprego da análise direta para a determinação de S em óleo diesel por HR-CS GF MAS, via molécula de CS.
- ⇒ Investigar diferentes modificadores químicos, em solução e permanentes, para estabilização do S contido na amostra;
- ⇒ Estudar a possibilidade do uso de soluções padrão aquosas para a calibração;
- ⇒ Determinar os parâmetros de mérito e verificar a exatidão do método proposto;
- ⇒ Aplicar o método desenvolvido na determinação de S em amostras de óleos diesel.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR

#### 4.1.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica modelo AAnalyst 800 (PerkinElmer, Norwalk, EUA) equipado com atomizadores de chama, forno de grafite e aquecimento eletrotérmico, amostradores automáticos (AS-90A e AS-800) e um sistema de injeção em fluxo automatizado (FIAS 400), foi utilizado para detecção das espécies de arsênio das amostras de alimentos infantis. A atomização do analito foi realizada em um multiatomizador, conforme descrito na seção 2.1.3, aquecido por resistividade elétrica em uma temperatura de 900 °C.

Uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL) de arsênio foi utilizada como fonte de radiação, operando com uma corrente de 376 mA. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 193,7 nm com uma resolução espectral de 0,7 nm. Como corretor de fundo, em todas as medidas, foi utilizada uma lâmpada de deutério. Os sinais analíticos, bem como o controle do instrumento e acessórios, foram realizados com o *software WinLab 32 for AA* (PerkinElmer). Os sinais analíticos obtidos foram exportados como arquivo de texto (.txt) e posteriormente processados no programa *Origin* versão 9.1 (Origin Lab Corp).

Foram utilizados controladores de vazão mássicos modelos, FMA-2617A e FMA-A2402 (Omega Engineering, EUA), respectivamente, para controle da vazão dos gases de arraste (He) e arraste/auxiliar na etapa de atomização (H<sub>2</sub>). Para controlar a vazão do ar atmosférico (ar comprimido), também auxiliar, na etapa de atomização, foi utilizado um medidor de vazão multigases, com válvula, modelo PMR1-010354 (Cole-Parmer, EUA).

Para controlar a entrada e saída de nitrogênio líquido do frasco de vidro de parede dupla onde o tubo em forma de “U” foi instalado, utilizou-se uma válvula solenoide (Rheodyne 5302, EUA). Uma fonte de energia (*Switching mode power supply*) modelo HCS 3202 (Manson Engineering, China), com faixa de trabalho de 1-36 V e

0-10 A, foi utilizada para o aquecimento da resistência elétrica posicionada ao longo da parte externa do tubo em forma de “U”.

Para o preparo das suspensões foi utilizado um banho ultrassônico com frequência de 35 kHz, modelo Elmasonic One D-78224 (Elma, Alemanha). O aquecimento (banho-maria) foi efetuado em uma chapa térmica, modelo 2107 (ETA, República Tcheca), com controle manual por imersão de um termômetro de mercúrio. O controle do ajuste de pH das suspensões foi realizado com um medidor de pH de portátil modelo H138 *minilab* (Hach, EUA). Para agitação dos tubos com as suspensões, foi utilizado um agitador do tipo vortex, modelo *Classic Advanced Vortex Mixer* (VELP Scientifica, Itália).

O ajuste do pH da solução tampão foi realizado em um potenciômetro digital, modelo SevenEasy (Mettler Toledo, Suíça) equipado com um eletrodo combinado de vidro com sensor de temperatura. A agitação da solução tampão foi realizada com um agitador magnético modelo Lab Disc White (IKA, Alemanha).

As amostras de alimentos infantis, do tipo papinhas, do Brasil foram liofilizadas em um liofilizador ModulyonD Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation, EUA) e moídas em um micromoinho A11 Basic (IKA, Alemanha).

As pesagens foram feitas em duas microbalanças: modelo AY220 (Shimadzu, Japão) e modelo M2P (Sartorius, Alemanha) ambas com resolução de 0,0001 g.

A digestão das amostras, para determinação de arsênio total, foi realizada em dois fornos micro-ondas: *(i)* TOPWave (Analytik Jena AG, Alemanha) e *(ii)* UltraWAVE (Milestone, Itália). A determinação do arsênio total foi realizada em dois espectrômetros de massa com plasma indutivamente acoplado: *(i)* PerkinElmer NexION 300D (PerkinElmer, EUA) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard, EUA) e uma câmara de spray ciclônica de quartzo (PerkinElmer, EUA); e *(ii)* Agilent 7700x (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com um amostrador automático Agilent ASX-500 (Agilent Technologies, Alemanha) e um nebulizador concêntrico Micro-Mist (Glass Expansion, EUA). Os equipamentos identificados com *i* pertencem ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis, Brasil; e os identificados com *ii* pertencem ao Instituto de Química Analítica da Academia de Ciências Tcheca, na cidade de Praga, República Tcheca. Na Tabela III estão descritos os principais parâmetros instrumentais dos equipamentos de ICP-MS utilizados.

**Tabela III.** Parâmetros instrumentais utilizados na determinação total de arsênio nas amostras de alimentos infantis por ICP-MS.

Parâmetro	Equipamento	
	NEXion 300D	Agilent 7700x
Potência de radiofrequência	1550 W	1600 W
Vazão do gás do plasma (Ar)	15 L min <sup>-1</sup>	16 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás auxiliar (Ar)	0,32 L min <sup>-1</sup>	0,55 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,85 L min <sup>-1</sup>	0,6 L min <sup>-1</sup>
Cela de colisão (He)	3,8 mL min <sup>-1</sup>	4,8 mL min <sup>-1</sup>
<i>Dwell time</i>	250 ms	250 ms
<i>Dead time</i>	45 ns	45 ns
Nebulizador	Meinhard concêntrico	Micro-Mist
Câmara de nebulização	Ciclônica	Ciclônica
m/z monitorado	<sup>75</sup> As, <sup>103</sup> Rh <sup>a</sup> e <sup>125</sup> Tl <sup>a</sup>	<sup>75</sup> As, <sup>103</sup> Rh <sup>a</sup> e <sup>125</sup> Te <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Padrões internos.

#### 4.1.2. Limpeza do material

Uma solução de HNO<sub>3</sub> concentrado P.A. (Merck, Alemanha) com concentração de ~1,5 mol L<sup>-1</sup> foi utilizada para limpeza de todos os frascos destinados ao armazenamento das soluções. O material a ser limpo era mergulhado em um frasco preenchido com a solução de HNO<sub>3</sub> ~1,5 mol L<sup>-1</sup> e deixado em contato com a mesma por um período de 24 horas. Após o material era retirado da solução ácida e lavado, no mínimo, três vezes com água ultrapura.

A limpeza do multiatomizador era feita pelo preenchimento do mesmo com uma solução composta por 30% (v/v) de HF P.A. (Spolchemie, República Tcheca) e 70% (v/v) de HNO<sub>3</sub> concentrado P.A. (Merck, Alemanha). A solução foi mantida no interior da cela de quartzo por 10 minutos e após a mesma foi enxaguada abundantemente com água ultrapura e seca antes do uso.

O sistema de geração de hidretos, bem como, os tubos de polipropileno utilizados para o preparo dos padrões de trabalho, foram limpos diariamente após o término do dia com uma solução de ácido clorídrico 1 mol L<sup>-1</sup> preparada a partir de HCl P.A. (Merck, Alemanha).



### 4.1.3. Reagentes e soluções

Todas as soluções e amostras foram preparadas com reagentes de grau analítico e com água ultrapura com uma resistividade específica de 18 M $\Omega$  cm obtidas por dois sistemas: Ultrapure (Watrex, EUA) e mega ROUP (Equisul, Brasil).

As soluções padrão das espécies de arsênio foram preparadas a partir da diluição em água de soluções estoque com concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> de: a) iAs – As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha); b) MMAs – Na<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Chem. Service, EUA); c) DMAs – H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub> (Strem Chemicals, EUA) e; d) TMAsO – (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>AsO (cortesia do Dr. Willian Cullen – Universidade da Columbia Britânica, Canadá). As soluções padrão para determinação de arsênio total por ICP-MS foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de As como As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha). Para a pré-redução das espécies de As, nos padrões, amostras e CRM foi utilizada a L-cisteína-HCl monohidratada (Merck, Suíça) em uma concentração de 2% (m/v).

Para a geração de hidretos, foi preparada diariamente uma solução redutora de NaBH<sub>4</sub> 1% (m/v) (Sigma-Aldrich, Alemanha) com KOH 0,1% (m/v) (P.A., Merck, Alemanha) para estabilização, que era filtrada após a preparação (ver item 4.1.4). Para evitar e reduzir a espuma durante a HG, foi adicionado à solução de NaBH<sub>4</sub> o antiespumante B (Sigma-Aldrich, Reino Unido) na concentração de 0,5% (v/v). Uma solução de Trizma<sup>®</sup> (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.HCl) (Sigma) 0,75 mol L<sup>-1</sup> com pH 6 foi utilizada para o controle do pH da mistura reacional durante a HG. O ajuste do pH foi realizado com uma solução de KOH 10% (m/v).

Para o preenchimento do dessecador dos gases provenientes da geração de hidretos, foi utilizado NaOH P.A. (Lach-Ner, República Tcheca) em pérolas com diâmetro entre 2-3 mm, pois foi observado que a utilização de pérolas com diâmetro inferior acarreta a retenção das arsinas no dessecador<sup>81</sup>.

O tubo em forma de “U” foi preenchido com Chromosorb WAW-DMCS 45/60 (Supelco, EUA) que é uma fase estacionária a base de diatomita (sílica) com tamanho de partícula de 45 a 60 mesh.

As soluções utilizadas no preparo das suspensões das amostras foram preparadas a partir da diluição do HCl P.A. (Merck, Alemanha), Hidróxido de tetrametilamônio 25% (m/v) (Sigma-Aldrich, Suíça) e HNO<sub>3</sub> concentrado P.A. (Merck, Alemanha) previamente

destilado (ver item 4.1.4). O mesmo  $\text{HNO}_3$ , também, foi utilizado na digestão das amostras para a determinação de arsênio total.

#### 4.1.4. Outros materiais

Um sistema de filtração a vácuo (Nalgene, EUA) com membrana de náilon de  $0,45 \mu\text{m}$  (Whatman, EUA) foi utilizado para remoção de material particulado da solução redutora ( $\text{NaBH}_4$ ) após o preparo.

O  $\text{HNO}_3$  concentrado utilizado foi purificado por destilação abaixo de seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo modelo duoPur 2.01E (Milestone, Itália).

#### 4.1.5. Sistema de HG-CT-AAS automatizado

##### 4.1.5.1. Análise por injeção em fluxo (FIA)

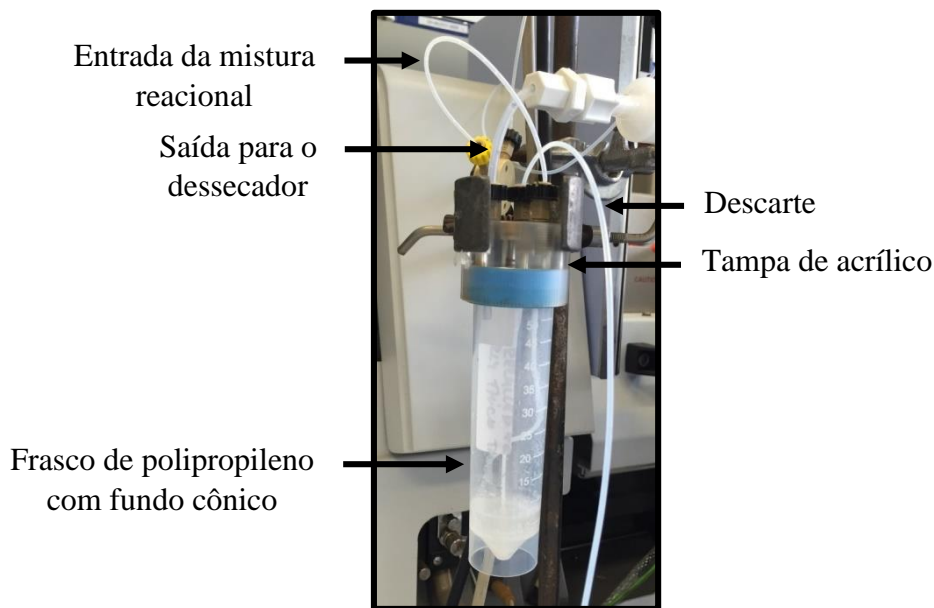
Foram utilizados tubos de politetrafluoretileno – PTFE (IDEX Health & Science, EUA), com  $1,58 \text{ mm}$  de diâmetro externo (d.e.) e  $1,00 \text{ mm}$  de diâmetro interno (d.i.) para condução dos reagentes ( $\text{NaBH}_4$  e tampão Trizma), de seus frascos até a bomba do sistema FIAS 400. A propulsão dos reagentes e amostra foi feita com tubos Tygon<sup>®</sup> de diferentes diâmetros, com uma mesma vazão de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Para a injeção dos padrões de As e amostra na forma de suspensão, foi utilizada uma ponteira para micropipeta de  $1000 \mu\text{L}$  conectada diretamente a um tubo Tygon<sup>®</sup>. Para condução dos líquidos após a propulsão e alça de reação, foram utilizados os mesmos tubos de PTFE citados anteriormente. Nos pontos de junção dos reagentes/amostra foram utilizadas conexões poliméricas de poliétercetona (PEEK) em forma de “T” ( $0,75 \text{ mm}$  de diâmetro) e flanges (RheFlex F6). A alça de reação utilizada para favorecer a combinação dos reagentes possuía um volume de  $0,8 \text{ mL}$  ( $1 \text{ m}$ ). Após a alça de reação, outra conexão de PEEK em forma de T foi utilizada para a inserção da mistura de He ( $60 \text{ mL min}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2$  ( $15 \text{ mL min}^{-1}$ ) no sistema. Esses gases eram conduzidos até esta conexão por um tubo de PTFE com  $1,58 \text{ mm}$  d.e. e  $0,5 \text{ mm}$  d.i. Os gases eram misturados, previamente, após a saída dos controladores mássicos em uma conexão metálica em forma de “T” (Swagelock) específica para gases.

Paralelamente, outra bomba do mesmo sistema foi utilizada para retirada do líquido/mistura reacional do interior do separador gás líquido (GLS) com os mesmos tipos de tubos citados, anteriormente, para a condução dos reagentes (PTFE e Tygon<sup>®</sup>).

Todo o controle do sistema FIAS foi realizado pelo mesmo programa de controle e coleta de dados do espectrômetro de absorção atômica (*WinLab 32 for AA*).

#### **4.1.5.2. Separador gás-líquido (GLS)**

O separador gás-líquido, Figura 4, foi construído com um tubo de centrífuga de polipropileno de fundo cônico (Sarstedt, Alemanha) com volume de 50 mL e tampa rosqueada do mesmo material. A tampa do tubo foi modificada para suportar a pressão (aproximadamente 1,5 atm) ocasionada pela passagem do gás de arraste pelo tubo em forma de “U”. Para isso, foi utilizada uma cobertura de acrílico com três orifícios rosqueados para o encaixe de flanges de PEEK (RheFlex, 2 F6 e 1 F8). O tubo de PTFE (1,58 mm d.e. / 1,00 mm d.i.) proveniente da alça de reação entrava no GLS por um flange PEEK F6 e a saída da mistura ocorria tangencialmente à parede do frasco, para minimizar a formação de aerossol, na metade de sua altura (marcação de 25 mL). A coleta forçada do resíduo de reação foi feita por um tubo PTFE (igual ao utilizado para a entrada da mistura reacional no frasco) posicionado na parte inferior do fundo cônico do frasco, que estava conectado ao GLS por um flange PEEK F6. Um tubo de PTFE, com 3,18 mm d.e. e 1.59 mm d.i., conectado ao GLS com um flange PEEK F8 foi utilizado para coleta e condução dos gases gerados e de arraste para o dessecador. A coleta foi realizada em uma altura corresponde a 3/4 da altura total do frasco.



**Figura 4.** Foto do separador gás-líquido, construído com um frasco de polietileno modificado, usado na análise de especiação de As por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador.

#### 4.1.5.3. Dessecador

Para a remoção de vapor de água e aerossol gerados na etapa de geração de hidretos foi utilizado um cartucho de polipropileno com 100 mm de comprimento e 20 mm d.e e 17 mm d.i. preenchido com ~25 g de NaOH com as especificações descritas no item 4.1.3. O fechamento das duas extremidades foi realizado com tampas de encaixe com sobreposição. O dessecador foi posicionado horizontalmente entre o separador gás líquido e o sistema de aprisionamento criogênico.

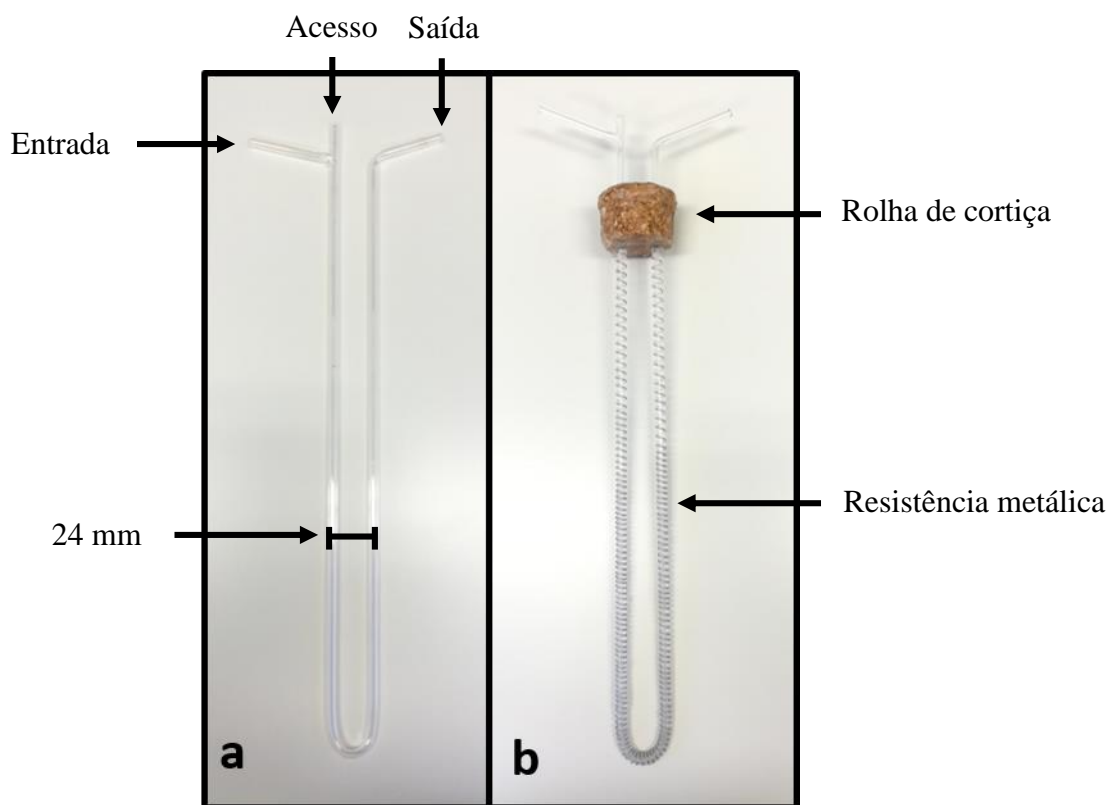
Diariamente, após o término das medidas, o cartucho era aberto na extremidade que havia sido utilizada como entrada da fase gasosa proveniente do GLS, para remoção do NaOH que havia absorvido água (~20 mm). Após a remoção, era realizada a reposição do NaOH P.A.

#### 4.1.5.4. Sistema de aprisionamento criogênico

O tubo em forma de “U” utilizado no sistema de aprisionamento criogênico foi confeccionado em quartzo e possuía 480 mm de comprimento total, 4,5 mm d.e., 2,5 mm d.i. e largura de 24 mm (Figura 5a). O tubo foi adquirido de uma empresa especializada

na manufatura de artefatos de vidro e quartzo para laboratório, localizada na cidade de Praga, República Tcheca. A entrada e saída do tubo em forma de “U” estavam posicionadas em um ângulo de  $\sim 45^\circ$  em relação ao sentido do “U”. O alongamento do tubo “U” em um dos lados (entrada) foi feito para auxiliar o preenchimento do mesmo com a fase estacionária e, também, para facilitar o acesso à sua parte interna, em caso de formação de gelo no interior do mesmo.

Uma resistência metálica com composição de Ni80/Cr20 (Omega Engineering, EUA) e 0,51 mm de diâmetro e resistividade de  $5,275 \Omega \text{ m}^{-1}$ , com uma resistência total de  $15 \Omega$ , foi utilizada para recobrir manualmente o tubo em forma de “U”. A resistência elétrica foi fixada ao tubo com a utilização de cola de silicone que foi espalhada ao longo de toda a extensão do tubo em forma de “U” (Figura 5a). Uma rolha de cortiça com  $\sim 45$  mm de diâmetro superior externo e  $\sim 40$  mm de diâmetro inferior externo, teve as laterais aparadas para ficar com diâmetro uniforme de  $\sim 40$  mm. Essa rolha foi cortada ao meio, no sentido do comprimento, e duas cavidades longitudinais paralelas entre si e às bordas laterais da rolha foram feitas em ambas as metades da cortiça. Nessas duas metades, foi aplicado cola de silicone e o tubo em forma de “U” foi encaixado em uma delas. Feito isso, as duas metades foram unidas resultando na forma que pode ser vista Figura 5b. A função da cortiça foi isolar, do meio externo, a parte interna do frasco de vidro de parede dupla onde o tubo em forma de “U” ficou em contato com o nitrogênio líquido.



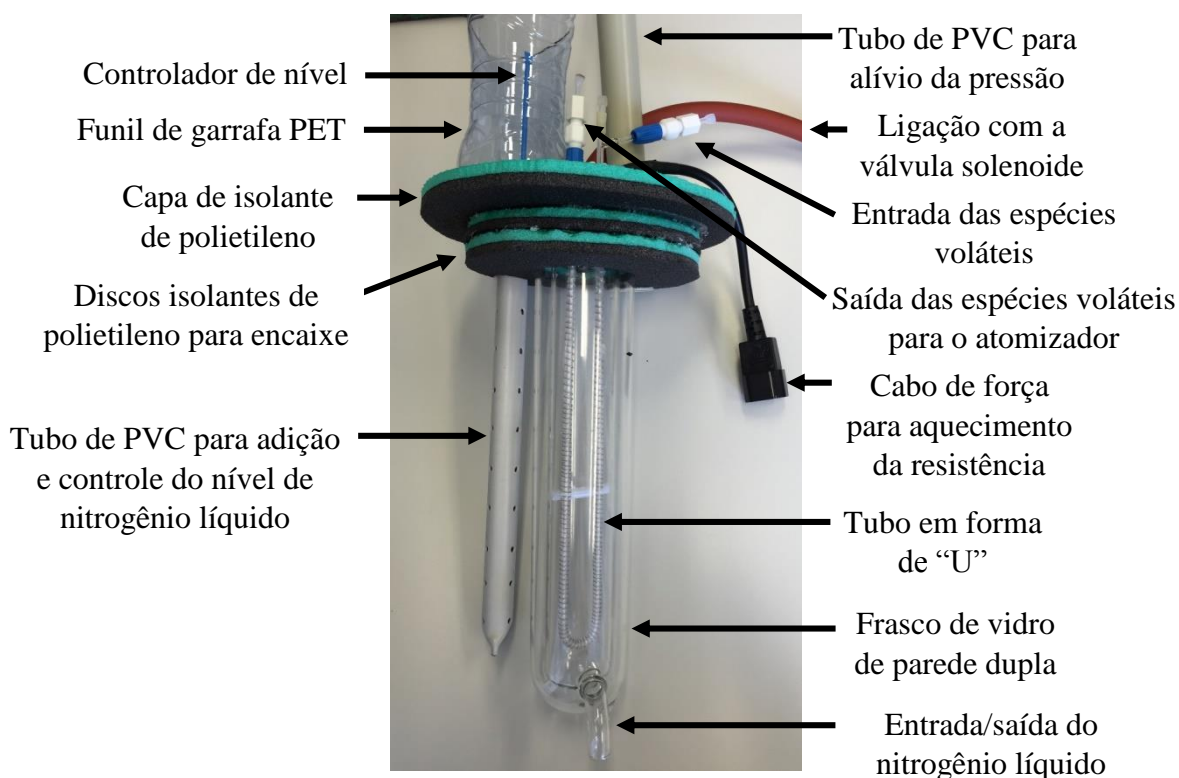
**Figura 5.** (a) tubo em forma de “U” de quartzo conforme era recebido do fornecedor; e (b) tubo em forma de “U” após o recobrimento do mesmo com uma resistência metálica (15  $\Omega$ ) e colocação da rolha de cortiça para isolamento.

As duas extremidades da resistência elétrica foram deixadas para fora da parte superior da rolha de cortiça e posteriormente foram conectadas à fonte de alimentação (descrita no item 4.1.1) por meio de um cabo de força.

Após a instalação e fixação da resistência e da cortiça para o isolamento térmico, o tubo de quartzo em forma de “U” foi preenchido com ~0,9 g da fase estacionária descrita na seção 4.1.3. Feito isso, foi inserido em ambas as extremidades do tubo “U”, uma pequena porção de lã de quartzo para evitar o deslocamento do Chromosorb em virtude da pressão positiva acarretada pelo fluxo de gases.

Após o preenchimento do tubo em forma de “U” com a fase estacionária (Chromosorb), o mesmo foi inserido dentro da cavidade interna (diâmetro de 40 mm) de um frasco de vidro (310 mm de comprimento total) que possuía parede dupla e vácuo entre as mesmas. A cavidade interna do frasco, onde o tubo em forma de “U” foi posicionada, era conectada com a parte externa de duas maneiras: por meio de um tubo localizado na parte inferior do mesmo que era utilizado para entrada e saída do nitrogênio líquido e por um outro tubo localizado na parte superior do frasco de vidro que era

conectado com a válvula solenoide (item 4.1.1). O arranjo do sistema de aprisionamento criogênico é apresentado na Figura 6.

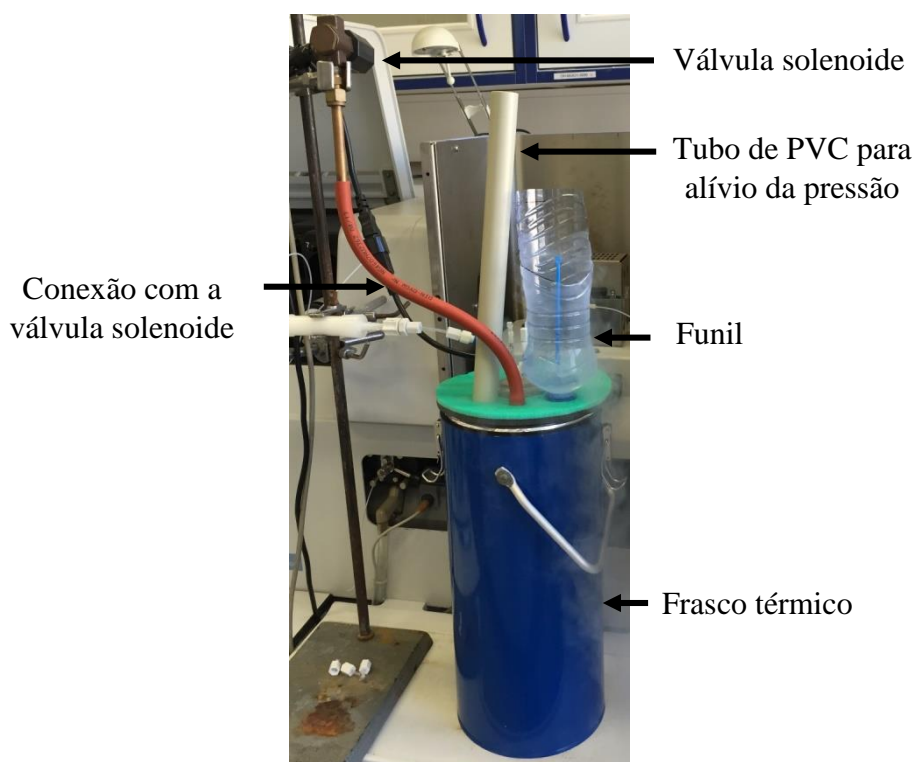


**Figura 6.** Foto do arranjo do sistema de aprisionamento criogênico para especiação de As por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador.

Na parte superior do frasco de vidro foram colocados discos de polietileno para servirem como suporte no encaixe do mesmo com um frasco térmico, no qual o frasco de vidro era colocado, e também como uma capa isolante com o meio externo. O frasco térmico utilizado possuía 160 mm d.e., 138 mm d.i., 375 mm de altura total e comportava um volume de até 4,2 L.

Foram feitos dois furos nas laterais dos discos de polietileno para a inserção de dois tubos de cloreto de polivinil (PVC). Um deles servia apenas para comunicar a parte interna do frasco térmico (que era preenchido com nitrogênio líquido) com o meio externo para impedir o aumento de pressão no interior do mesmo. O outro, que ficava imerso no nitrogênio líquido possuía vários furos ao longo de seu comprimento e tinha a parte inferior fechada. Esse tubo de PVC tinha duas funções: uma foi a reposição do nitrogênio líquido no frasco térmico e, por isso, foi conectado com uma garrafa de politereftalato de etileno (PET) cortada ao meio, que servia como um funil e ficava posicionada na parte

externa do sistema; e a outra foi servir como suporte para a utilização de uma “boia” que tinha como função monitorar o nível de nitrogênio líquido dentro do frasco térmico, que foi mantido constante. Esse medidor de nível foi construído com dois canudinhos de refrigerante (um conectado ao outro) e na parte inferior (que foi vedada), instalou-se um pedaço cilíndrico de isopor, para que o mesmo flutuasse no líquido. O sistema de aprisionamento criogênico completo utilizado para análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado é apresentado na Figura 7.



**Figura 7.** Foto do sistema de aprisionamento criogênico completo, para a especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador.

Durante a etapa de coleta das arsinas, o nitrogênio líquido permanecia no interior do frasco de vidro de parede dupla, em contato com o tubo “U”. Para a volatilização dos hidretos, a válvula solenoide conectada ao sistema era fechada automaticamente pelo sistema FIAS e a resistência elétrica começava a ser aquecida. Dessa forma, parte do nitrogênio líquido, que estava em contato com a resistência elétrica, se transformava em nitrogênio gasoso, expandindo-se e expulsando o nitrogênio líquido de dentro do frasco de parede dupla que saía pela abertura existente na parte inferior do mesmo (entrada/saída do nitrogênio líquido indicado na Figura 6). As diferentes arsinas, eram então volatilizadas de acordo com os seus pontos de ebulição e transportadas para o



atomizador/detector. Depois da volatilização das arsinas e limpeza do tubo “U” (por aquecimento prolongado), a válvula solenoide era aberta automaticamente pelo programa do sistema FIAS e o gás nitrogênio era expelido, através dessa válvula, para a exaustão de gases. Esse alívio na pressão interna do frasco de vidro com parede dupla permitia que o nitrogênio líquido entrasse novamente no frasco (pela mesma abertura por onde havia saído previamente) e ficasse em contato com o tubo em forma de “U”. Feito isso, o sistema automatizado de HG-CT-AAS ficava pronto para uma nova medida.

#### **4.1.5.5. Atomização**

Para a atomização dos hidretos foi utilizado o multiatomizador (descrito na seção 2.1.3), aquecido por resistividade elétrica a uma temperatura de 900 °C. Um fluxo de ar com vazão de 25 mL min<sup>-1</sup> foi adicionado ao multiatomizador como fonte de oxigênio.

#### **4.1.6. Amostras e material de referência certificado**

Dois tipos diferentes de alimentos comerciais destinados à alimentação de bebês e crianças foram analisados nesse trabalho: mistura de cereais para o preparo de mingau (MC) e papinhas do tipo refeição (PR). Como pode ser observado na Tabela IV, em todas as amostras utilizadas nesse trabalho, o arroz era um dos ingredientes do produto.

No Brasil foram adquiridas duas amostras de MC e quatro amostras de PR, de produção brasileira. As amostras de PR foram liofilizadas e moídas para facilitar o transporte e garantir a homogeneidade das mesmas, visto que era possível notar a presença de grãos inteiros de arroz e pedaços de vegetais. As amostras de MC eram comercializadas em pó.

Na Alemanha foram adquiridas três amostras de MC e duas amostras de PR, produzidas nos Estados Unidos. Nesse caso, as amostras de PR não foram liofilizadas nem moídas, por não haver grande traslado e por já apresentarem uma homogeneidade adequada por serem comercializadas na forma de purê. As amostras de MC, assim como as adquiridas no Brasil, eram em pó.

Um resumo com informações das amostras que foram utilizadas nesse trabalho é apresentado na Tabela IV.

**Tabela IV.** Informações e composição majoritária das amostras utilizadas na análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado.

Amostra	País de produção	Composição majoritária
MC1	Brasil	Farinha de arroz.
MC2	Brasil	Farinha de arroz, farinha de aveia e extrato de malte.
MC3	EUA	Farinha de arroz.
MC4	EUA	Farinha de arroz integral orgânico.
MC5	EUA	Farinha de arroz e lecitina de girassol.
PR1	Brasil	Água, batata, peito de peru, mandioquinha, cenoura, chuchu, polpa de abóbora e farinha de arroz.
PR2	Brasil	Água, batata, cenoura, carne, brócolis, polpa de abóbora, cebola, arroz e feijão.
PR3	Brasil	Água, peito de frango, batata, cebola, lentilha, polpa de abóbora, mandioquinha, chuchu, couve, arroz e farinha de arroz.
PR4	Brasil	Água, batata, cenoura, carne, cebola, polpa de abóbora e farinha de arroz.
PR5	EUA	Água, cenoura, frango, suco de pera, farinha de arroz integral.
PR6	EUA	Água, batata-doce, peru, ervilha, farinha de arroz integral, farinha de trigo integral.

Para verificar a exatidão do método foi utilizado o material de referência certificado ERM-BC211 (*European Reference Materials*, Bélgica), de arroz, que possuía valores certificados para arsênio total ( $260 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), arsênio inorgânico total, isto é,  $i\text{As}^{\text{III+V}}$  ( $124 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e DMAs ( $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Na determinação do arsênio total, por ICP-MS, foram utilizados os materiais de referência certificado ERM-BC211 e SRM NIST 1568a (*National Institute of Standards and Technology*, EUA) para verificar a exatidão do método utilizado para a digestão das amostras. O SRM NIST 1568a, também de arroz, possuía um valor certificado de arsênio total de  $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$ .

#### 4.1.7. Preparo de Amostra

##### 4.1.7.1. Preparo da amostra na forma de suspensão para especificação de arsênio por HG-CT-AAS

###### 4.1.7.1.1. Liofilização

As amostras PR1, PR2, PR3 e PR4 foram pesadas em placas de Petri e posteriormente congeladas. Após 12h em um freezer, as placas contendo as amostras foram transferidas para o liofilizador e liofilizadas até peso constante. Após esse procedimento as amostras foram moídas em um moinho de facas e armazenadas em frascos apropriados. O teor de umidade foi calculado pela diferença do peso inicial das amostras (*in natura*) e do peso final, após a liofilização. O teor de umidade nas amostras variou de 79 a 85%.

###### 4.1.7.1.2. Preparo da amostra na forma de suspensão

As amostras (0,4-0,5 g de MC ou 0,25-0,30 g de PR) foram pesadas diretamente dentro dos frascos de polipropileno com capacidade para 50 mL. Após a pesagem foi adicionado, sobre as amostras, 5 mL do reagente que seria testado no preparo da suspensão. Foi avaliado o uso de soluções de: hidróxido de tetrametil amônio 0,64, 1,10, 1,54 e 2,00 mol L<sup>-1</sup>; ácido clorídrico 1,0, 3,0, 4,5 e 6,0 mol L<sup>-1</sup> e; ácido nítrico 0,28, 0,56 e 1,00 mol L<sup>-1</sup>. Feita a adição do reagente sobre a amostra, os frascos eram colocados em um banho ultrassônico por 15 minutos. Na sequência, as amostras eram posicionadas em um banho-maria com uma temperatura de 85-90 °C, controlada manualmente com um termômetro de mercúrio, onde permaneciam por um período de tempo de 20 minutos. Após, as amostras eram resfriadas até temperatura ambiente e submetidas novamente ao banho ultrassônico por mais 15 minutos.

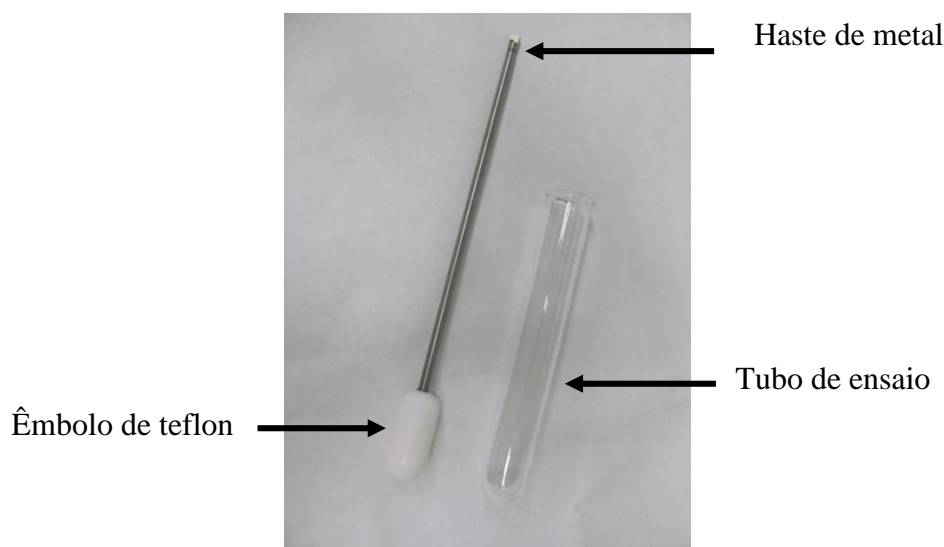
Depois dos procedimentos descritos, foi adicionada às suspensões, preparadas com ácido, quantidade suficiente de uma solução de KOH 80% (m/v) para elevar o pH a ~7. Já, nas suspensões preparadas com TMAH, foi adicionada quantidade suficiente de uma solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, para ajustar o pH a ~7. Para a pré-redução das espécies de As foi adicionado 1 mL de L-cisteína-HCl 20% (m/v). A suspensão foi avolumada para 10 mL com água ultrapura e após foi colocada por 15 segundos no agitador do tipo

*vortex*. O pH final da suspensão ficou entre 1 e 3 (devido a adição do pré-redutor) e a concentração final de L-cisteína-HCl foi de 2% (m/v). A suspensão foi analisada após uma hora, que é o tempo mínimo necessário para a pré-redução das espécies de arsênio<sup>53</sup>. Os brancos foram preparados com os mesmos reagentes e sofreram o mesmo tratamento descrito anteriormente.

Para a verificação da exatidão do método foi utilizada uma massa do CRM ERM-BC211, que continha a quantidade aproximada de iAs utilizada no padrão de trabalho. Esse assunto será abordado novamente na seção 5.1.3.

#### 4.1.7.1.3. Homogeneização

As amostras PR2, PR3 e PR4 precisaram ser homogeneizadas, para formação da suspensão, porque foram observadas obstruções no sistema de HG, com o preparo de amostra descrito anteriormente. Para isso, foi utilizado um sistema de homogeneização construído pelo grupo de pesquisa do Professor Jiří Dědina que havia sido utilizado anteriormente para amostras biológicas (fígado e músculo de rato)<sup>90</sup>. O sistema consistiu em uma haste de metal com uma peça de teflon em uma das pontas (êmbolo). Essa haste de metal foi fixada em uma furadeira elétrica doméstica e então o êmbolo de teflon foi inserido em um frasco de vidro de parede grossa (tipo tubo de ensaio) onde estava a amostra. A furadeira foi então acionada por aproximadamente 30 segundos. O procedimento promoveu a quebra das partículas contidas na suspensão da amostra pelo atrito entre o êmbolo e a parede do frasco. A homogeneização das amostras PR2, PR3 e PR4 foi realizada após a segunda etapa de banho ultrassônico (seção 4.1.7.1.2). Após esse procedimento, as três suspensões foram submetidas ao restante do procedimento descrito anteriormente (ajuste do pH, adição do pré-redutor e avolumadas para 10 mL). A foto do sistema utilizado para a homogeneização das amostras é apresentada na Figura 8.



**Figura 8.** Foto do sistema utilizado para homogeneizar as amostras de alimentos infantis do tipo papinha.

#### 4.1.7.2. Preparo de amostra para determinação de arsênio total por ICP-MS

As amostras MC1, MC2, PR1, PR2, PR3 e PR4, bem como o SRM 1568a, foram digeridas no forno de micro-ondas TOPwave (Analytik Jena AG, Alemanha), equipado com frascos de teflon, nas dependências do laboratório do grupo de pesquisa do Prof. Bernard Welz no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis. As amostras MC3, MC4, MC5, PR5 e PR6, bem como, o CRM ERM-BC211 foram digeridos no forno de micro-ondas UltraWAVE, equipado com frascos de quartzo, nas dependências do laboratório do grupo de pesquisa do Prof. Jiří Dědina, na Academia de Ciências Tcheca, na cidade de Praga.

O método de digestão ácida assistida por micro-ondas utilizado, foi baseado na indicação do fabricante do forno de micro-ondas TOPwave para a digestão de amostras de alimentos.

Uma massa de 0,5 g de cada amostra e dos CRMs, foi pesada diretamente dentro dos frascos de digestão. Foi adicionado 3 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado purificado, 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) e 2 mL de água ultrapura. Para o branco, foi adicionado apenas os reagentes e a água. Após esse procedimento os frascos foram levados diretamente ao forno de micro-ondas e submetidos ao programa de aquecimento apresentado na Tabela V. As digestões para as amostras, CRMs e brancos foram feitas em triplicata.

**Tabela V.** Programa com os parâmetros utilizados para a digestão ácida assistida por micro-ondas para a determinação total de arsênio por ICP-MS.

Parâmetro	Etapas do programa		
	1	2	3
Temperatura, °C	145	170	190
Pressão, bar	40	40	40
Rampa, min	2	2	2
Tempo, min	5	10	10
Potência, W	800	1500	1500

Depois da digestão, as amostras foram transferidas para balões volumétricos e o volume completado a 20 mL com água ultrapura. O tempo total de digestão foi de aproximadamente 3 horas, incluindo a pesagem das amostras e CRMs e o resfriamento. As digestões foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras e CRMs.

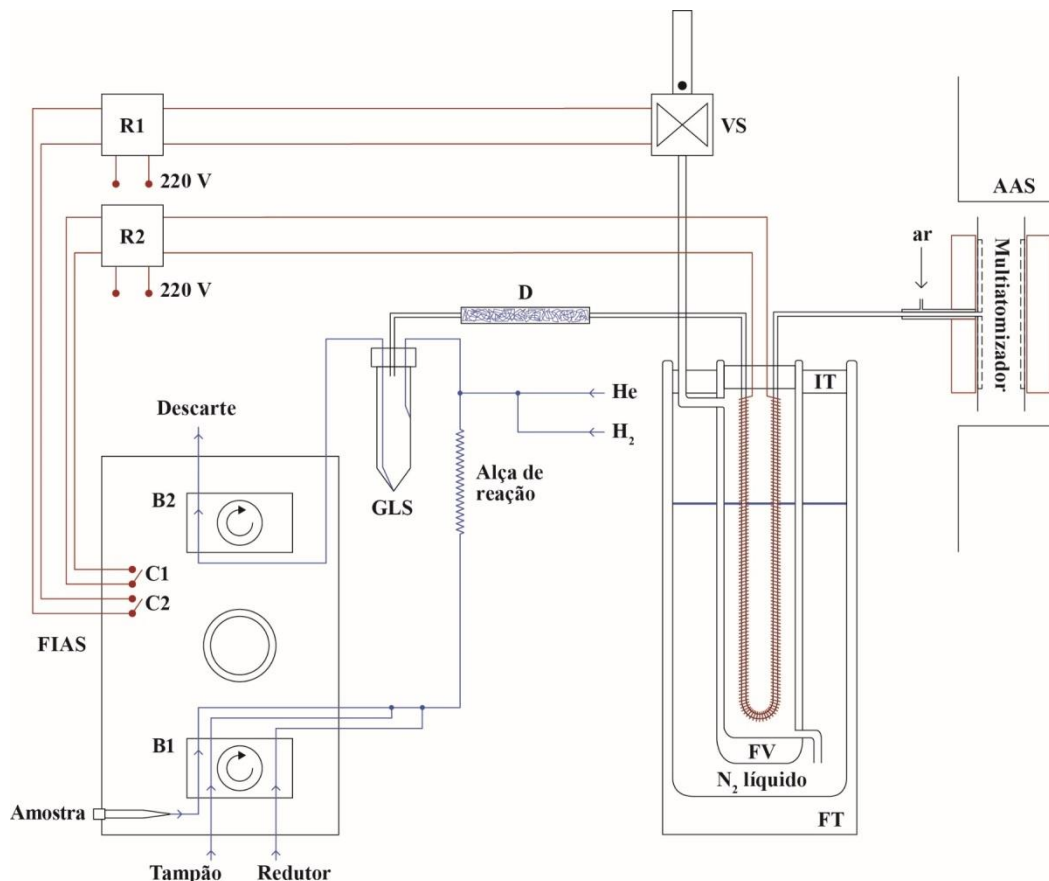
#### 4.1.8. Procedimento para a análise de especiação de arsênio em alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador

Como citado na revisão bibliográfica, o sistema utilizado para a especiação química de arsênio nesse trabalho foi apresentado por Matoušek *et al.*<sup>53</sup> e se baseia na geração de hidretos voláteis de arsênio e separação com a utilização de um sistema de aprisionamento criogênico (CT) automatizado. Os hidretos gerados foram aprisionados em um tubo em forma de “U”, preenchido com uma fase estacionária, que estava em contato com nitrogênio líquido. Após a etapa de coleta, o tubo foi aquecido e as espécies de arsênio, que estavam aprisionadas no tubo em forma de “U”, foram volatilizadas sequencialmente, de acordo com seus pontos de ebulição (Tabela VI).

**Tabela VI.** Compostos de arsênio e pontos de ebulição de suas respectivas arsinas.

Composto de arsênio	Fórmula molecular da arsina correspondente	Ponto de ebulição °C
iAs	AsH <sub>3</sub>	- 62
MMA <sub>s</sub>	CH <sub>3</sub> AsH <sub>2</sub>	2
DMA <sub>s</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsH	36
TMA <sub>s</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As	70

Após a volatilização as arsinas foram conduzidas pelos gases de arraste e arraste/auxiliar de atomização para o multiatomizador onde a detecção foi feita por AAS. Um esquema do sistema utilizado para a especificação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado é apresentado na Figura 9.



**Figura 9.** Esquema do sistema utilizado para a especificação de arsênio em alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador. Onde: FIAS é o acessório para análise de injeção em fluxo, modelo FIAS 400; B1 e B2 são bombas peristálticas; C1 e C2 são os controladores do FIAS 400; R1 e R2 são os relés da fonte de energia e da válvula solenoide, respectivamente; VS é a válvula solenoide; GLS é o separador gás-líquido; D é o dessecador preenchido com NaOH; FV é o frasco de vidro; FT é o frasco térmico; IT é o suporte/isolante térmico e AAS é o espectrômetro de absorção atômica AAAnalyst 800. Esquema adaptado de Matoušek *et al.*<sup>53</sup>

Todo o sistema, isto é, o acionamento das bombas peristálticas, da válvula solenoide, da fonte de aquecimento da resistência, foi automatizado e controlado pelo acessório FIAS 400. Apenas a colocação da amostra foi feita de forma manual, dessa

forma, 500  $\mu\text{L}$  do padrão ou suspensão eram inseridos em uma ponteira de micropipeta que estava fixada ao acessório FIAS 400 e conectada ao sistema. Feito isso, o programa do sistema automatizado foi iniciado no *WinLab 32 for AA* com a sequência, adaptada de Matoušek *et al.*<sup>53</sup>, apresentada na Tabela VII.

**Tabela VII.** Programa utilizado para a análise de especiação de arsênio por HG-CT-AAS automatizado. Corrente de 2 A e voltagem de 31,9 V.

Etapa	Tempo s	Bomba 1 <sup>a</sup> rpm	Bomba 2 <sup>b</sup> rpm	Leitura s	Solenóide	Aquecimento do tubo “U”	Observação
0	5	48	0	-	aberta	não	Injeção
1	70	48	0	-	aberta	não	Injeção
2	75	0	90	-	aberta	não	Descarte
3	17	0	0	-	fechada	sim	pré- aquecimento/ saída do N <sub>2</sub>
4	80	0	0	58	fechada	sim	aquecimento/ limpeza
5	60	0	0	-	aberta	não	resfriamento/ entrada do N <sub>2</sub>
6	1	0	0	-	aberta	não	Resfriamento

<sup>a)</sup> Utilizada para a injeção da amostra, padrão e CRM

<sup>b)</sup> Utilizada para a retirada da mistura reacional do GLS e envio ao descarte

A etapa 0 da sequência foi destinada ao preenchimento da alça de amostragem do sistema FIAS com a amostra, mas como esse item do FIAS não foi utilizado e não foi possível excluir essa etapa do programa, utilizou-se um tempo de 5 segundos. A porta de injeção do FIAS não foi utilizada para evitar obstruções nas partes que compõem o sistema, já que se utilizou a amostra na forma de suspensão. Foi nessa etapa que os reagentes (NaBH<sub>4</sub> e tampão) e a amostra começaram a ser injetados no sistema.

Durante a etapa 1, os reagentes foram adicionados juntamente com a amostra, com uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>. Após a injeção completa da amostra, que se dava antes do término dos 60 segundos, foi adicionado na ponteira de pipeta utilizada para a injeção, 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura para o carreamento de possíveis gotículas da suspensão que poderiam ter ficado nas paredes da ponteira de injeção. Depois da mistura dos reagentes e amostra na alça de reação, onde se deu a formação dos hidretos voláteis de arsênio, os



gases de arraste ( $\text{He}$ ,  $60 \text{ mL min}^{-1}$ ) e arraste/auxiliar de atomização ( $\text{H}_2$ ,  $15 \text{ mL min}^{-1}$ ) foram injetados à mistura e introduzidos no GLS para a remoção dos hidretos gerados da fase aquosa. Na sequência, a mistura gasosa foi conduzida para o dessecador e, posteriormente, aprisionados no tubo em forma de “U” imerso em nitrogênio líquido.

Na etapa 2 a bomba peristáltica 2 foi acionada para a remoção da mistura reacional do interior do GLS para o descarte.

No decorrer das etapas 3 e 4, após o fechamento da válvula solenoide, o aquecimento gradual das paredes do tubo em forma de “U” foi realizado para o pré-aquecimento, que inclui a expulsão do nitrogênio líquido do interior do frasco de vidro, e para a volatilização das espécies previamente aprisionadas na fase estacionária. Como citado anteriormente, o aquecimento foi feito por uma resistência elétrica conectada a uma fonte de energia. O tempo de leitura do sinal analítico foi de 58 segundos, que era o tempo máximo permitido pelo programa *WinLab 32 for AAS*. Após esse período, a resistência elétrica permaneceu ligada por mais 22 segundos para limpeza do tubo em forma de “U”, isto é, para a remoção das espécies de arsênio que eventualmente pudessem ter ficado retidas na fase estacionária e/ou parede do tubo de quartzo.

A válvula solenoide voltava para a posição aberta na etapa 5, permitindo novamente a entrada do nitrogênio líquido no interior do frasco de vidro e consequente resfriamento do tubo em forma de “U”. A etapa 6 precisou ser usada, pois era o número mínimo de etapas permitido pelo *software* que controlava o sistema.

Após a finalização de todas as etapas do programa apresentado na Tabela VII, o sistema estava pronto para uma nova leitura. Era no ínterim, entre uma medida e outra que o nível de nitrogênio líquido no interior do frasco térmico era verificado e completado, quando necessário.

#### 4.1.9. Determinação de arsênio total por ICP-MS

Para a determinação de arsênio total foram utilizados dois ICP-MS. As amostras adquiridas no Brasil foram analisadas no NexION 300D (PerkinElmer, EUA) no laboratório do Prof. Dr. Daniel Gallindo Borges, do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis. Já as amostras de procedência dos Estados Unidos, adquiridas na Alemanha, foram analisadas no Agilent 7700x (Agilent Technologies, Alemanha), nas dependências do laboratório do grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Jiří Dědina, na Academia de Ciências Tcheca,

na cidade de Praga. Em ambos os equipamentos foi utilizado gás He na cela de colisão para a eliminação de interferências, principalmente a causada pelo íon cloreto ( $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ ).

#### **4.1.10. Parâmetros de mérito**

##### **4.1.10.1. Limites de detecção e quantificação**

Os valores dos limites de detecção e limite de quantificação dos métodos para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS automatizado e determinação de As total por ICP-MS, foram calculados como três vezes ( $3\sigma$ ) e dez vezes ( $10\sigma$ ) o valor do desvio padrão de dez medidas do branco da digestão, respectivamente.

## 4.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA

### 4.2.1. Instrumentação

Todas as medidas foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) que possui dois atomizadores, chama e forno de grafite aquecido transversalmente, em diferentes compartimentos, mas apenas o atomizador de forno de grafite foi utilizado durante os experimentos. O equipamento foi controlado por um programa, instalado em um microcomputador, desenvolvido pela fabricante do equipamento, que também registrou os dados gerados.

Estudos preliminares foram realizados em tubos (Analytik Jena, Part N° 407-A81.303) e plataformas (Analytik Jena, Part N° 407-152.023) de grafite recobertos com grafite pirolítico destinados à amostragem sólida. Uma pinça pré-ajustada que faz parte de um acessório de amostragem sólida manual, modelo SSA 6 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), foi utilizada para inserir as plataformas no tubo de grafite.

Demais experimentos foram realizados em tubos de grafite com plataforma integrada - PIN (Analytik Jena, Part N° 407-A81.025) e sem plataforma integrada (Analytik Jena, Part N° 407-A81.011), recobertos com grafite pirolítico. As amostras e soluções foram introduzidas no forno por um amostrador líquido, modelo MPE 60 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha).

Para a avaliação do sinal, via molécula de CS, foi utilizada a linha analítica de 258,0560 nm. Em todas as medidas considerou-se a absorvância do volume de pico selecionado (PVSA)<sup>162</sup> CP  $\pm$  1, que corresponde à soma da  $A_{\text{int}}$  do *pixel* central (CP), situado no centro da linha analítica e cada um de seus *pixels* adjacentes ( $\pm 1$ ). O volume de *pixels* monitorados correspondeu a 4,29 pm. O sistema de correção de fundo interativo (IBC) foi utilizado em todos os experimentos. Argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil), foi usado como gás de purga, com um fluxo de 2,0 L min<sup>-1</sup> durante todas as etapas, exceto durante a etapa de vaporização, quando o fluxo do mesmo foi interrompido. Uma microbalança M2P (Satorius, Alemanha) foi usada para pesagem dos padrões e uma balança analítica (Gibertini, Itália) com precisão de 0,0001 g foi usada para pesar as amostras antes da diluição.

O programa de aquecimento do forno de grafite utilizado para a determinação de enxofre, via molécula de CS, é apresentado na Tabela VIII, para os tubos com plataforma integrada e na Tabela IX, para os tubos sem plataforma.

Em ambos os tubos, para as medidas das amostras e do CRM, o modificador em solução era injetado no tubo e seco previamente com a aplicação das duas primeiras etapas de secagem. Depois disso, a amostra era injetada no tubo e submetida a todo o programa de aquecimento constante na Tabela VIII ou Tabela IX.

**Tabela VIII.** Programa de aquecimento utilizado na determinação de S, via molécula de CS, por HR-CS GF MAS em tubo com plataforma integrada (PIN).

Etapa	Temperatura °C	Rampa °C s <sup>-1</sup>	Permanência s
Secagem 1	60 / 100 <sup>a</sup>	3	30 / 10 <sup>a</sup>
Secagem 2	110 / 120 <sup>a</sup>	3	30 / 10 <sup>a</sup>
Secagem 3	140 / 150 <sup>a</sup>	3	30 / 10 <sup>a</sup>
Secagem 4	270 / 250 <sup>a</sup>	5	20 / 5 <sup>a</sup>
Pirólise	1100	100	30 / 20 <sup>a</sup>
Vaporização	2500	1200	5
Limpeza	2600	1000	4

<sup>a)</sup> Parâmetros utilizados para o CRM diluído com 1-propanol.

**Tabela IX.** Programa de aquecimento utilizado na determinação de S, via molécula de CS, por HR-CS GF MAS em tubo sem plataforma integrada.

Etapa	Temperatura °C	Rampa °C s <sup>-1</sup>	Permanência s
Secagem 1	90	3	20
Secagem 2	110	3	20
Secagem 3	150	5	15
Secagem 4	250	5	15
Pirólise	1100	100	20
Vaporização	2500	1200	5
Limpeza	2600	1000	4

#### 4.2.2. Reagentes e soluções

No preparo de todas as soluções foram utilizados reagentes de grau analítico e água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q Academic (Millipore, Bedford, MA), com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C. Toda a vidraria utilizada para o preparo de soluções, bem como os frascos usados para o armazenamento das soluções padrão, modificadores químicos e amostras, foram lavados e descontaminados em um banho de ácido nítrico (Vetec Química, Brasil) 10% (v/v) em água ultrapura, onde foram mantidos por pelo menos 24 horas. Após esse período, todo o material foi enxaguado três vezes com água ultrapura em abundância.

Soluções aquosas estoque dos padrões com 1000 mg L<sup>-1</sup> de enxofre foram preparadas a partir da diluição de massas apropriadas de DL-cisteína (Sigma-Aldrich, Eslováquia), L-cisteína (Sigma-Aldrich, Japão) e ácido sulfâmico (Acros Organics, New Jersey, EUA) em água. As soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir de diluições adequadas das soluções estoque de DL-cisteína, L-cisteína e ácido sulfâmico. Durante o trabalho a DL-cisteína foi substituída pela L-cisteína por problemas de solubilidade da substância em água.

Os seguintes reagentes foram investigados como modificadores químicos: Pd (II) 10 g L<sup>-1</sup> (Fluka, Suíça), Mg (II) 10 g L<sup>-1</sup> (Fluka, Suíça), ambos como nitrato em solução com 17% (v/v) de HNO<sub>3</sub>; Ca (II) 1,0 g L<sup>-1</sup> (Fluka, Suíça), como carbonato em solução 2% de HNO<sub>3</sub> (v/v); Ir (III) 1,0 g L<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha), como cloreto em 10% HCl, Ru (III) 1,0 g L<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha), como cloreto em 7% de HCl; e Zr 1,0 g L<sup>-1</sup> (Fluka, Suíça), como nitrato em 2% de HNO<sub>3</sub> e 0,2% de HF. Triton X-100 (Union Carbide) foi adicionado às soluções de modificadores químicos quando os mesmos eram aplicados sobre as amostras de óleo diesel (item 5.2.2).

Para diluição das amostras foi utilizado 1-propanol 99,5% (Synth, São Paulo, Brasil).

#### 4.2.3. Amostras de óleo diesel e material de referência certificado

Nos estudos preliminares amostras de óleo diesel S50, S500 e S1800 com teores de enxofre desconhecidos foram utilizadas. Nas etapas seguintes do trabalho, as seguintes amostras de óleo diesel foram utilizadas: S10-A, S10-B, S500-A e S500-B. Todas as amostras foram fornecidas pelo Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes

e Óleos (CECOM) do Instituto de Química da Universidade Federal Rio Grande do Sul. As amostras de óleo diesel S10-A e S10-B tiveram a concentração de enxofre determinada pelo método padrão ASTM D 5453:2012. A exatidão do método foi confirmada com o material de referência certificado (CRM) de enxofre em óleo diesel NIST 2724b (*National Institute of Standards and Technology*, EUA), com uma concentração de enxofre certificada de  $426,5 \pm 5,7 \text{ mg kg}^{-1}$ .

#### 4.2.4. Diluição das amostras

As amostras e o CRM foram diluídas com 1-propanol e para determinar a melhor concentração da amostra no álcool, soluções com as seguintes concentrações foram estudadas: 0,05, 0,125 e 0,25  $\text{kg L}^{-1}$  de diesel em 1-propanol. As soluções eram preparadas pouco antes da análise. Para isso uma quantidade de óleo diesel apropriada era pesada em tubos de centrífuga com capacidade para 1 mL que depois eram preenchidos com 1-propanol até a marca indicativa de 1 mL.

#### 4.2.5. Procedimento para determinação indireta de enxofre em óleo diesel por HR-CS GF MAS com amostragem direta

O irídio, zircônio e rutênio usados como modificadores permanentes foram depositados nas plataformas dos tubos PIN com a injeção de dez alíquotas de 40  $\mu\text{L}$ , cada, a partir das soluções dos modificadores testados. Após cada injeção o tubo de grafite era submetido às etapas de 1 a 6 do programa de temperatura constante na Tabela X. O programa de temperatura completo (de 1 a 7) só era aplicado após a última injeção da solução de modificador. Após o término do processo era obtida a deposição de uma massa de 400  $\mu\text{g}$  de Ir, Zr ou Ru nas plataformas dos tubos de grafite PIN. O mesmo procedimento foi utilizado para o recobrimento dos tubos sem plataforma e para as plataformas dos tubos para amostragem de sólidos.

**Tabela X.** Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento dos fornos de grafite, na determinação de enxofre por HR-CS GF MAS.

Etapa <sup>a</sup>	Temperatura °C	Rampa °C s <sup>-1</sup>	Permanência s
1	90	6	20
2	100	7	20
3	130	7	30
4	160	100	30
5	1000	100	20
6	1400	100	5
7	2000	600	4

Um volume de 20 µL da solução padrão e 20 µL do modificador químico em solução foram injetados juntamente no tubo de grafite. Nas medidas das amostras de óleo diesel e CRM (diluídos ou não), o modificador químico em solução foi aplicado no tubo de grafite e seco até a etapa de “secagem 2” constante na Tabela IX, com intuito de evitar a efusão da amostra da plataforma devido a imiscibilidade do combustível com o modificador químico em solução. Somente após a secagem do modificador químico em solução, 5 ou 10 µL da amostra de óleo diesel era injetada no tubo de grafite e todas as etapas constantes na Tabela IX eram aplicadas. Na etapa de estudos preliminares (item 5.2.2), o modificador químico era aplicado diretamente sobre a amostra de óleo diesel.

Soluções com diferentes concentrações de Pd/Mg – 1/0,5, 2/1, 3/1,5/4/2 e 6/3 g L<sup>-1</sup> de Pd/Mg para obtenção de massas de 20/10, 40/20, 60/30, 80/40 e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente – foram preparadas para possibilitar a injeção de um volume constante de 20 µL de modificador em solução no tubo de grafite durante o estudo de otimização da massa de Pd/Mg. Somente para as massas de Pd/Mg de 100/50 µg e 140/70 µg é que foi necessário a utilização de 25 µL e 35 µL de 4/2 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesses casos, devido ao elevado volume injetado no tubo de grafite, também foi necessário secar (etapa de secagem 1, Tabela VIII) o modificador químico em solução antes da injeção da solução padrão de enxofre.

#### 4.2.6. Parâmetros de mérito

##### 4.2.6.1. Limites de detecção, quantificação e massa característica

Os valores dos limites de detecção ( $3\sigma$ ) e limite de quantificação ( $10\sigma$ ) foram calculados a partir de um branco que era a mesma água ultrapura empregada no preparo da solução padrão aquosa de S. O modificador químico também foi utilizado. Os volumes foram os mesmos empregados para solução padrão e modificador químico, descritos na seção 4.2.5.

A massa característica,  $m_0$ , é definida como a massa de analito necessária para produzir um sinal de  $A_{\text{int}}$  de  $0,0044 \text{ s}^{135}$ . A massa característica foi calculada a partir de uma carta controle do padrão com concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de S que foi monitorado por 24 dias.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão estão divididos de acordo com a ordem estabelecida anteriormente na revisão bibliográfica e parte experimental. Assim, primeiramente serão apresentados os resultados obtidos na análise de especiação de arsênio em alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador, que foi realizado nas dependências do Instituto de Química da Academia de Ciências Tcheca, na cidade de Praga, sob a supervisão do Professor Dr. Jiří Dědina, durante os 12 meses de estágio doutoral (doutorado sanduíche). Na sequência serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na determinação indireta de enxofre em óleo diesel por HR-CS GF MAS com amostragem direta, que foi realizado juntamente ao Grupo de Análises de Traço nas dependências no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, sob orientação da Professora Dra. Maria Goreti R. Vale e coorientação da Professora Dra. Morgana Bazzan Dessuy.

## 5.1. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE ARSÊNIO EM ALIMENTOS INFANTIS NA FORMA DE SUSPENSÃO POR HG-CT-AAS AUTOMATIZADO E MULTIATOMIZADOR

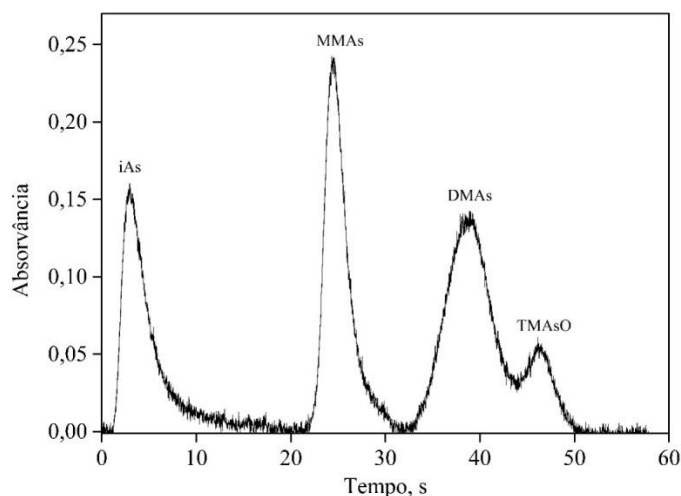
### 5.1.1. Otimização e desempenho do sistema de HG-CT-AAS automatizado

O sistema automatizado de HG-CT-AAS com multiatomizador que já foi previamente aplicado na análise de especiação química de arsênio em diferentes tipos de amostras biológicas<sup>53,90-92</sup> foi montado (seção 4.1.5) e aplicado na especiação de As em amostras de alimentos infantis preparadas na forma de suspensão.

Os parâmetros do sistema de aprisionamento criogênico (Tabela VII) foram otimizados levando-se em consideração a  $A_{int}$  e a resolução do cromatograma das espécies de As. Para isso, foram utilizadas diferentes soluções padrão contendo as seguintes espécies de arsênio: (i) solução mista de iAs, MMAs, DMAs e TMAOs; (ii) solução mista de iAs, MMAs e DMAs; (iii) solução mista de iAs e DMAs; e (iv) solução com apenas TMAOs. A concentração final de cada uma das espécies de As nas soluções padrão foi de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  e o volume utilizado foi de  $500 \mu\text{L}$ , totalizando  $1 \text{ ng}$  de cada composto arsenical. Às soluções padrão *i*, *ii* e *iii* foi adicionada uma massa de L-cisteína-HCl suficiente para uma concentração final de 2% (m/v). Com a adição da L-cisteína as espécies de As são convertidas à suas formas trivalentes e, como consequência disso, suas sensibilidades são uniformizadas, alcançando a eficiência máxima na geração de hidretos, conforme já foi citado anteriormente na seção 2.1.4. A solução padrão *iv*, de TMAOs, foi medida sem a adição de L-cisteína-HCl<sup>53,90</sup> devido ao fato dessa substância utilizada para a pré-redução, converter o TMAOs para sua forma volátil  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ , como citado anteriormente na seção 2.1.4<sup>73</sup>. É importante lembrar que as arsinas provenientes das diferentes formas de arsênio possuem pontos de ebulição distintos (Tabela VI) e isso implicará na ordem dos picos constantes nos cromatogramas.

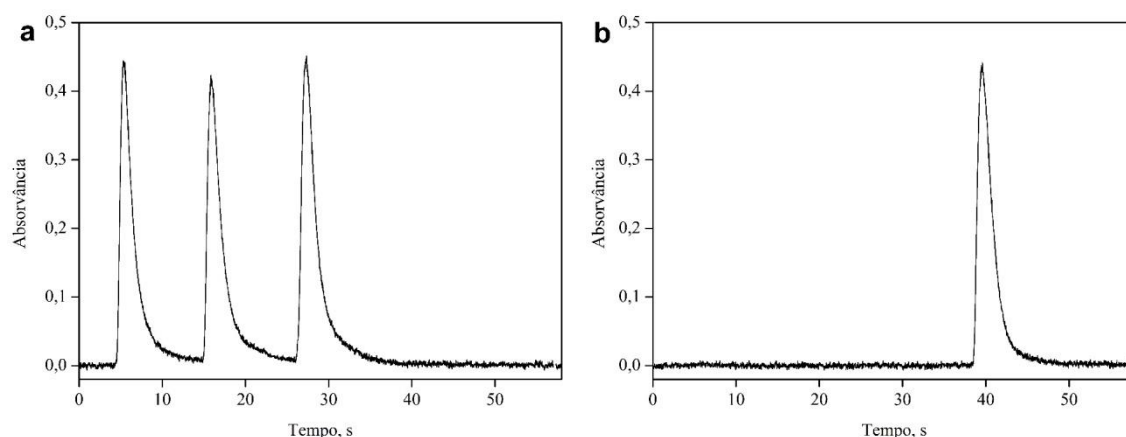
Após as medidas da solução padrão *i*, observou-se uma separação ineficiente das espécies DMAs e TMAOs, como pode ser visto na Figura 10. Isso pode ser explicado pela alta taxa de aquecimento da resistência utilizada para a volatilização das arsinas. Na tentativa de melhorar a resolução de separação, foram utilizados menores valores de corrente elétrica para o aquecimento do tubo em “U”, i.e., a taxa de aquecimento foi diminuída, e também foram feitas algumas modificações no tempo das etapas do

programa do sistema FIAS (Tabela VII), mas nenhuma melhora na eficiência de separação das espécies de DMAs e TMAOs, foi observada com essas alterações.



**Figura 10.** Cromatograma obtido a partir da medida de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão contendo 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de iAs, MMAs, DMAs e TMAOs com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl. Corrente: 1,8 A; Voltagem: 28 V (para o aquecimento do tubo “U”).

Em virtude do que foi exposto, a solução padrão *ii*, que continha iAs, MMAs e DMAs foi empregada para avaliar a sensibilidade para as espécies de As. A solução padrão *iv*, composta apenas por TMAOs, sem L-cisteína-HCl, foi medida para fim de comparação da sensibilidade com a das outras espécies de As. Os cromatogramas obtidos nessas medidas são apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Cromatogramas obtidos a partir das medidas de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão (a) contendo 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de iAs, MMAs e DMAs, com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl e (b) contendo 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de TMAOs, sem L-cisteína-HCl. Corrente: 2,0 A; Voltagem: 32 V (para o aquecimento do tubo “U”).

Os valores de  $A_{\text{int}}$  dos quatro compostos de arsênio ficaram muito próximos entre si e concordantes com os resultados reportados, previamente, na determinação de As por HG-CT-AAS automatizado<sup>53</sup> e também com as sensibilidades reportadas com a utilização do sistema de aprisionamento criogênico miniaturizado<sup>92</sup>. Na Tabela XI são apresentadas as sensibilidades relativas das quatro espécies de As, obtidas a partir da medida das soluções padrão aquosas *ii* e *iv*, que foram calculadas considerando a  $A_{\text{int}}$  obtida para o iAs como 100%.

**Tabela XI.** Sensibilidades relativas, considerando a  $A_{\text{int}}$  do iAs sendo 100%, para as espécies iAs, MMAs e DMAs em uma solução padrão aquosa com  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada uma dessas espécies (com L-cisteína-HCl 2% m/v), e TMAOs em uma solução padrão aquosa com  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  dessa espécie (sem a adição de L-cisteína-HCl), por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador.  $n = 5 \pm$  desvio padrão.

Espécie	iAs	MMAs	DMAs	TMAOs
Sensibilidade	$100 \pm 3$	$103 \pm 2$	$105 \pm 3$	$102 \pm 3$

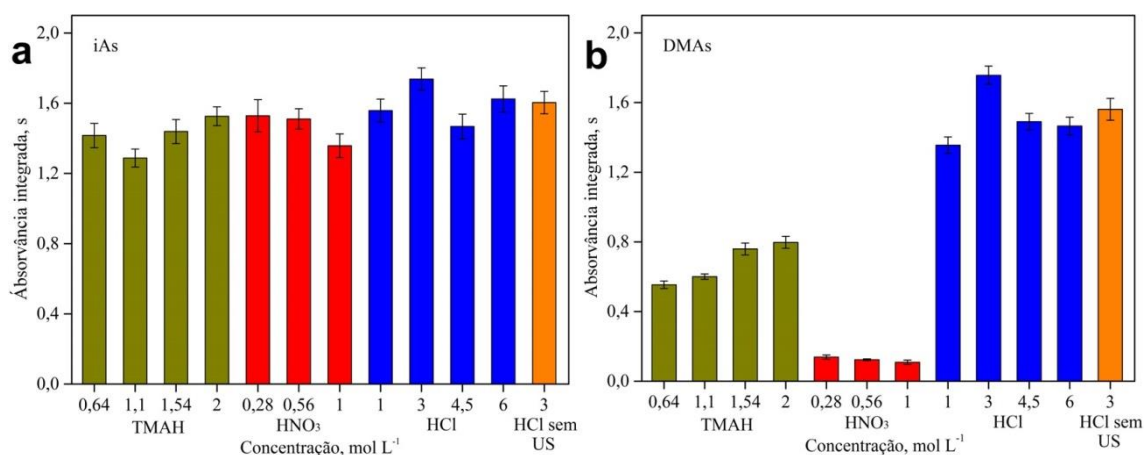
Como já abordado na revisão bibliográfica, os resultados para a especiação de As em alimentos infantis reportam que o As presente nos mesmos encontra-se majoritariamente na forma de iAs e DMAs. Com base nisso, passou-se a utilizar a solução padrão *iii*, que possuía apenas essas duas espécies, como padrão de controle, sendo esta medida em todos os dias de trabalho para monitoramento da sensibilidade do sistema de HG-CT-AAS automatizado.

### 5.1.2. Preparo da amostra na forma de suspensão

Levando em consideração a necessidade da utilização de condições brandas para manter a integridade das espécies de As durante o preparo da suspensão<sup>95-99</sup>, foi estudado o uso de diferentes soluções como diluente para o preparo das suspensões. Portanto, foram investigados reagentes que já haviam sido empregados no preparo de amostra de alimentos infantis, são eles:  $\text{HNO}_3$ <sup>4,5,55,56</sup> (0,28, 0,56 e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), TMAH<sup>58</sup> (0,64, 1,10, 1,54 e  $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{HCl}$ <sup>57</sup> (1, 3, 4,5 e  $6 \text{ mol L}^{-1}$ ). Além dos reagentes, algumas concentrações também já haviam sido empregadas ( $\text{HNO}_3$   $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ <sup>5</sup> e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ <sup>57</sup>;  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ <sup>57</sup>).

Em um estudo preliminar, com a amostra MC1, apenas o uso da agitação ultrassônica à temperatura ambiente não foi suficiente para o preparo da suspensão com nenhum dos três reagentes testados. As amostras ficaram com consistência pastosa e com aglomerados (pelota), não sendo possível realizar a pipetagem das mesmas. Para contornar o problema e auxiliar o preparo das suspensões, as amostras, após o banho ultrassônico, foram aquecidas<sup>3,5,58</sup> em banho-maria a 85-90 °C e, na sequência, foram submetidas novamente à agitação ultrassônica. Ao serem retiradas do banho-maria as amostras preparadas com ácido diluído, apresentavam aparência fluida e não foi mais observada a presença de aglomerados. O aquecimento da amostra com o diluente, leva à gelatinização do amido e o meio ácido promove a hidrólise dos carboidratos complexos e do amido que compõe a matriz da amostra<sup>2</sup>, que é o componente majoritário dessa amostra. Nesse sentido, a segunda etapa de agitação ultrassônica foi aplicada objetivando uma maior eficiência na extração das espécies de As. Além do mais, a energia ultrassônica promove uma agitação efetiva que contribui para a homogeneidade da suspensão<sup>102</sup>. Na amostra preparada com TMAH, a suspensão final (após os processos de neutralização com HCl e adição da L-cisteína-HCl), embora estivesse mais fluida, ainda apresentava a presença de pequenos aglomerados gelatinosos, mas isso não impediu a pipetagem e injeção no sistema de HG-CT-AAS automatizado.

Na Figura 12 são apresentados os resultados obtidos, em  $A_{int}$ , para o preparo da amostra MC1 na forma de suspensão com os diferentes reagentes e concentrações testadas. Todas foram submetidas à etapa de aquecimento em banho-maria e a avaliação do uso da agitação ultrassônica foi realizado para a condição que apresentou a maior  $A_{int}$  para iAs e DMAs.

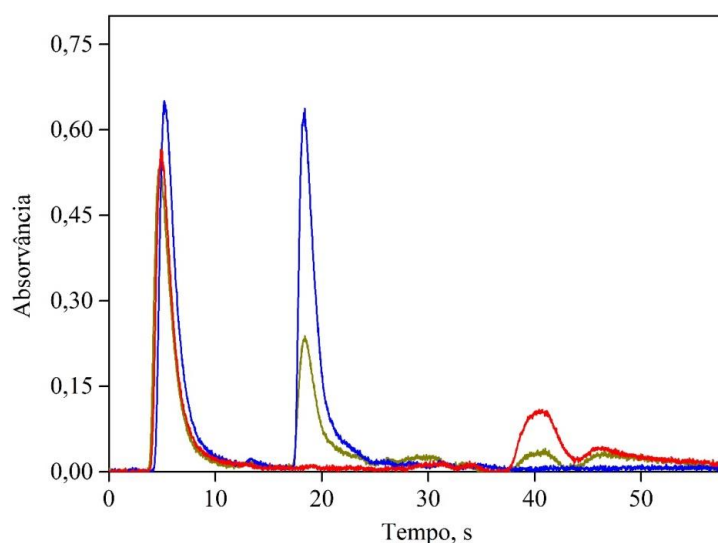


**Figura 12.** Absorvância integrada para (a) iAs e (b) DMAs com o uso de diferentes reagentes e concentrações em solução aquosa no preparo da amostra MC1 na forma de suspensão. Em todas as condições apresentadas as suspensões foram aquecidas a 85-90 °C em banho-maria por 20 minutos. A agitação ultrassônica foi aplicada em duas etapas de 15 minutos cada, antes e depois do banho-maria. (■) TMAH com agitação ultrassônica; (■) HNO<sub>3</sub> com agitação ultrassônica; (■) HCl com agitação ultrassônica e; (■) HCl sem agitação ultrassônica.

Como pode ser visto na Figura 12, os maiores valores de  $A_{int}$ , para iAs e DMAs, foram obtidas com o emprego de HCl 3 mol L<sup>-1</sup> e agitação ultrassônica, no preparo da suspensão da amostra. Após essa constatação, foi preparada uma nova suspensão com o emprego de HCl 3 mol L<sup>-1</sup> que foi submetida apenas ao aquecimento. E como mostrado na Figura 12, os valores de  $A_{int}$  para as duas espécies de As, nessa condição, foram inferiores às observadas nas suspensões preparadas com o emprego da agitação ultrassônica. Em termos de valores, a suspensão não submetida ao banho ultrassônico apresentou valores de  $A_{int}$ , 8 e 13% inferiores, para iAs e DMAs, respectivamente, que a suspensão onde o procedimento fora aplicado. Isso demonstra que a agitação ultrassônica desempenha um importante papel na disponibilização das espécies de As contidas na matriz da amostra, visto que, em termos de homogeneidade e estabilidade, ambas as suspensões, com ou sem agitação ultrassônica, não apresentaram diferenças visuais. Esse aumento de sinal observado pode ser atribuído à extração das espécies de As para o meio líquido<sup>102</sup> ou pela facilitação da entrada do redutor (NaBH<sub>4</sub>), durante a etapa de HG, nas partículas da amostra presentes na suspensão<sup>60,101</sup>. Isso só poderia ser afirmado se a suspensão fosse centrifugada e apenas o sobrenadante tivesse sido utilizado, o que não foi feito nesse trabalho, mas foi realizado por Matos-Reyes *et al.*<sup>57</sup>. Esses autores

utilizaram a agitação ultrassônica no preparo de suspensões de amostras de arroz e semolina com uma solução de HCl, que na sequência foram centrifugadas e apenas o sobrenadante foi empregado para a determinação de iAs por HG AFS. Os autores relataram recuperações de 95 e 100%, para as amostras de arroz e semolina, respectivamente, o que indica que o iAs fora extraído para o meio líquido, já que não existiam partículas sólidas presentes no extrato.

Com respeito aos diferentes reagentes testados, um fato observado foi a diferença no perfil dos picos, das espécies de iAs e DMAs, nos cromatogramas obtidos, que são apresentados na Figura 13.



**Figura 13.** Cromatogramas obtidos com o emprego de (■) TMAH 2 mol L<sup>-1</sup>, (■) HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e (■) HCl 3 mol L<sup>-1</sup> no preparo da suspensão da amostra MC1. Todas as suspensões foram submetidas ao aquecimento à 85-90 °C em banho-maria (20 min) e duas etapas de agitação ultrassônica (15 min cada), antes e depois do aquecimento. Corrente: 2,0 A; Voltagem: 32 V.

O uso do HNO<sub>3</sub> no preparo das suspensões suprimiu por completo o pico da espécie de DMAs no tempo de retenção de 20 s e originou a presença de um outro pico no tempo de retenção de 40 s. Isso sugere que o HNO<sub>3</sub> alterou a forma química do DMAs. Embora o pico tenha aparecido no tempo de retenção de 40s, que é o tempo de retenção correspondente à espécie TMAs, não se pode afirmar ou sugerir que essa alteração ocorreu, em virtude de o perfil do pico obtido com a amostra não ser semelhante com a o obtido na medida do padrão. O mesmo foi observado com o uso do TMAH, mas nesse

caso não houve uma supressão completa do DMAs, já que a existência de um pequeno perfil de absorvância pôde ser observado no tempo de retenção de 20 s. O emprego da base (TMAH) no preparo da suspensão da amostra, da mesma forma que o HNO<sub>3</sub>, gerou o surgimento de um pico no tempo de retenção de 40 s, mas este foi menor que o observado com o ácido. Nenhum dos fatos observados, com o emprego desses dois reagentes, pode ser explicado em virtude de a literatura ser escassa sobre a análise de especiação química de As em amostras de alimentos por HG-CT-AAS. Por outro lado, os trabalhos sobre especiação química de As em alimentos infantis por HPLC-ICP-MS citaram o uso de HNO<sub>3</sub>, para extração das espécies de As da amostra, e não relataram nenhuma alteração na especiação do DMAs, o que sugere que essa alteração na espécie DMAs tenha ocorrido durante a HG. É importante salientar que, com o uso de HCl, essas alterações na especiação do DMAs, não foram observadas no cromatograma, como pôde ser visto na mesma figura.

Para o iAs, pôde-se constatar apenas que a sensibilidade para essa espécie foi menor com o emprego do TMAH e HNO<sub>3</sub>, do que com a utilização do HCl, no preparo da suspensão da amostra.

Frente ao exposto, o preparo da suspensão com a solução de HCl 3 mol L<sup>-1</sup>, com aquecimento em banho-maria e duas etapas de agitação ultrassônica, para a análise de especiação de As em amostras de alimentos infantis por HG-CT-AAS automatizado, foi utilizada em todos os experimentos futuros.

### **5.1.3. Curvas de calibração e parâmetros de mérito**

#### ***5.1.3.1. Análise de especiação química de As por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador***

Para a análise de especiação, as curvas de calibração foram construídas com soluções padrão aquosas contendo a mesmas concentrações de iAs e DMAs. Todas as soluções padrão continham 2% (m/v) de L-cisteína-HCl, para a pré-redução das espécies de arsênio, e foram medidas no mínimo uma hora após a sua adição nas soluções. Na construção da curva de calibração foi utilizado um branco e cinco soluções padrão aquosas com concentrações na faixa de concentração de 0,5 a 5,0 µg L<sup>-1</sup> (0,25 a 2,5 ng) de cada uma das espécies de arsênio. As medidas foram realizadas em quintuplicata.



Também foram calculados o LOD ( $3\sigma$ ) e o LOQ ( $10\sigma$ ) instrumental e do método, sendo que para o cálculo do LOD e LOQ do método, foi considerada uma massa de amostra de 25 mg que foi a massa contida em 500  $\mu$ L de suspensão da amostra (amostra de mistura de cereais, MC). Uma síntese dos parâmetros de mérito calculados para a análise de especiação química de As em alimentos infantis por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador é apresentado na Tabela XII.

**Tabela XII.** Parâmetros de mérito para análise de especiação química de As em amostras de alimentos infantis na forma de suspensão por HG-CT-AAS automatizado e calibração com soluções padrão aquosas com 2% (m/v) de L-cisteína-HCl.

Parâmetro	Espécie de As, $\lambda = 193,7$ nm		
	iAs	MMAAs	DMAs
Coeficiente angular, $s\ ng^{-1}$	$1,00 \pm 0,01$	-	$1,05 \pm 0,01$
Coeficiente de correlação, R	0,9999	-	0,9999
Faixa de trabalho, ng	0,036 - 2,5	0,02 - 2,5	0,013 - 2,5
LOD, $ng^a / \mu g\ kg^{-1}\ b$	0,011 / 0,44	0,006 / 0,24	0,004 / 0,16
LOQ, $ng^a / \mu g\ kg^{-1}\ b$	0,036 / 1,44	0,020 / 0,80	0,013 / 0,52

<sup>a)</sup> LOD e LOQ instrumentais

<sup>b)</sup> LOD e LOQ do método calculados para 25 mg de amostra em 500  $\mu$ L da suspensão

Os LODs instrumentais calculados de 0,01, 0,006 e 0,004 ng para iAs, MMAAs e DMAs, respectivamente, foram de 10 a 15 vezes menores, que os reportados por Matoušek *et al.*<sup>53</sup>. Isso pode ser explicado pelo fato dos autores não terem utilizado o dessecador para a remoção do vapor de água, aerossóis e produtos de decomposição da L-cisteína-HCl formados na HG, que eram aprisionados no tubo em forma de “U” e, conseqüentemente, volatilizados e conduzidos ao multiatomizador causando oscilações nas medidas dos brancos<sup>81</sup>. Em outro trabalho, com a aplicação da técnica de HG-CT-AAS automatizada na análise de especiação química de As em fígado de rato<sup>100</sup>, o LOD instrumental reportado foi de 0,01 ng para iAs, que é o comparável com o encontrado nesse trabalho. O mesmo valor de LOD de 0,01 ng, foi relatado para MMAAs e 0,012 ng para o DMAs, que são superiores aos resultados expressados na Tabela XII.

Llorente-Mirandes *et al.*<sup>54</sup> aplicando LC-ICP-MS, para especiação de As em alimentos infantis, relata valores de LOQs do método de 20  $\mu g\ kg^{-1}$  para iAs e 10  $\mu g\ kg^{-1}$  para MMAAs e DMAs. Já, Juskelis *et al.*<sup>5</sup>, aplicando a técnica de HPLC-ICP-MS, também na especiação de As em alimentos infantis, reporta ter encontrado valores

de LOQs do método de 13,6, 9,2 e 6,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para iAs, MMAs e DMAs, respectivamente. Ambos os valores de LOQ do método calculados utilizando estas duas técnicas cromatográficas diferentes, ambas acopladas ao ICP-MS, foram bem superiores aos 1,44, 0,80 e 0,52 para iAs, MMAs e DMAs, respectivamente, encontrados nesse trabalho. Isso reafirma o que foi citado anteriormente, de que o emprego da técnica de HG-CT-AAS automatizada, é uma alternativa bem menos onerosa e mais acessível frente às técnicas cromatográficas à líquido (LC, IC, AEC e HPLC) acopladas ao ICP-MS.

Foi citado anteriormente que, uma das vantagens do uso da L-cisteína-HCl na pré-redução das espécies de As é a uniformização da sensibilidade das mesmas, possibilitando, assim, que a calibração seja realizada com apenas uma das espécies. Mesmo assim, como pôde ser visto na Tabela XII, foi utilizada uma solução padrão contendo iAs e DMAs, e foi construída uma curva de calibração para cada uma dessas espécies. Isso foi realizado, para que fosse possível comparar os coeficientes angulares obtidos, para essas duas espécies em solução padrão aquosa e os obtidos em suspensões da amostra, fortificadas com iAs e DMAs, no estudo de verificação da existência de efeito de matriz da amostra.

Para verificar a existência de efeito de matriz da amostra, na análise de especiação de As, foram realizados testes de recuperação do analito e curvas analíticas com o método das adições múltiplas (adição de padrão). Após a construção das curvas, os coeficientes angulares e lineares calculados foram comparados com os obtidos a partir das curvas de calibração externa construídas com soluções padrão aquosas. Nesse sentido, três alíquotas da amostra MC1 foram fortificadas com 1, 2 e 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de iAs e DMAs, respectivamente, antes do início do procedimento de preparo da suspensão. Paralelamente, mais seis alíquotas da amostra MC1 foram pesadas e não foram fortificadas. As nove alíquotas, fortificadas (3) e não fortificadas (6), foram submetidas ao procedimento de preparo da suspensão descrito anteriormente (HCl 3 mol  $\text{L}^{-1}$ , agitação ultrassônica, aquecimento e agitação ultrassônica). Após a retirada das alíquotas da amostra da agitação ultrassônica, em 3 suspensões que não haviam sido fortificadas, foram adicionados iAs e DMAs para se obter, também, uma concentração final de 1, 2 e 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Depois disso, as nove suspensões foram tratadas igualmente como descrito na seção 4.1.7.1.2. Para facilitar o reconhecimento dos dois conjuntos distintos no texto que segue, o das suspensões que foram fortificadas antes do preparo da suspensão será identificado por FA (fortificado antes) e o outro conjunto por FD (fortificado depois). O outro conjunto com 3 suspensões, que não havia sido fortificado, foi analisado e a média

utilizada para o cálculo das recuperações. Após a análise dos conjuntos de suspensões FA e FD, foram construídas curvas analíticas com o método das adições múltiplas para o iAs e DMAs, utilizando-se, como o primeiro ponto de cada uma das curvas, o valor da média do conjunto que não havia sido fortificado.

As recuperações foram calculadas dividindo-se os valores de  $A_{int}$  obtidos para as amostras fortificadas (FA e FD), pela soma da média da  $A_{int}$  obtida com a triplicata de amostras não fortificadas com os respectivos valores de  $A_{int}$  obtidos na curva de calibração para as soluções padrão com concentração de iAs e DMAs de 1, 2 e 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados obtidos para as recuperações de iAs e DMAs nos conjuntos FA e FD, não apresentaram diferenças significativas. Para o iAs, no conjunto FA as recuperações ficaram na faixa de 95-98% e para o DMAs na faixa de 99-101%. Já no conjunto FD, as recuperações do iAs ficaram na faixa de 96-98% e para o DMAs na faixa de 98-102%. Os resultados, de iAs e DMAs, obtidos na análise das suspensões fortificadas antes e após o procedimento de preparo das mesmas, não diferiram significativamente em um nível de confiança de 95% conforme o teste estatístico *t-student* pareado. Os coeficientes angulares para as espécies iAs e DMAs nos conjuntos FA e FP, bem como os obtidos com as soluções padrão aquosa, são apresentados na Tabela XIII.

**Tabela XIII.** Coeficientes angulares e lineares para as espécies iAs e DMAs obtidos a partir de amostras fortificadas antes e depois do preparo da suspensão e soluções padrão aquosas, por HG-CT-AAS automatizado.

Espécie de As	Método das adições múltiplas		Calibração externa
	FA <sup>a</sup>	FD <sup>b</sup>	Solução padrão aquosa
iAs	0,98 ± 0,01 <sup>c</sup> 0,9998 <sup>d</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>c</sup> 0,9996 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,01 0,9999 <sup>d</sup>
DMAs	1,06 ± 0,02 0,9992 <sup>d</sup>	1,04 ± 0,02 0,9998 <sup>d</sup>	1,05 ± 0,01 0,9999 <sup>d</sup>

<sup>a)</sup> Amostra fortificada antes do preparo da suspensão

<sup>b)</sup> Amostra fortificada depois do preparo da suspensão

<sup>c)</sup> Coeficiente angular,  $\text{s ng}^{-1}$

<sup>d)</sup> Coeficiente linear (R)

Como pode ser visto na Tabela XIII, os coeficientes angulares e lineares para as espécies iAs e DMAs nas suspensões da amostra que foram fortificadas antes e depois do preparo das mesmas, não diferiram daqueles calculados com as soluções padrão aquosas.

Esses resultados, somado àqueles obtidos com os testes de recuperação, sugerem, que a matriz da amostra não interferiu na análise de especiação de As.

Para avaliar a exatidão do método para análise de especiação química de As por HG-CT-AAS automatizado, foi utilizado o CRM de arroz ERM-BC211, que possuía teores certificados para tAs de  $260 \mu\text{g kg}^{-1}$ , iAs de  $124 \mu\text{g kg}^{-1}$  e DMAs de  $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A massa do CRM utilizada no preparo da suspensão foi de, aproximadamente, 160 mg, que em um volume final de 10 mL, resultava na concentração aproximada de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada uma das espécies de As na suspensão. Essa concentração das espécies de As era a mesma da solução padrão de controle preparada diariamente. As suspensões do CRM não puderam ser preparadas com as mesmas massas utilizadas para as amostras pois a concentração das espécies de As extrapolaria o limite superior da faixa de trabalho, que era de 2,5 ng para iAs e DMAs.

Os resultados obtidos para iAs e DMAs, nas suspensões do CRM, apresentados na Tabela XIV não diferiram significativamente dos valores certificados com um nível de confiança de 95% segundo o teste *t-student*. Isso indica que o método adotado para o preparo da suspensão não causou conversão das espécies de As, sendo assim, eficiente para a análise de especiação de As nos produtos de arroz, por HG-CT-AAS automatizado com multiatomizador. O valor de tAs encontrado foi calculado pela soma das espécies iAs, MMAs e DMAs determinadas no CRM.

**Tabela XIV.** Resultados analíticos obtidos por HG-CT-AAS automatizado na especiação de As no CRM ERM-BC211 na forma de suspensão. As concentrações são a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 5$ , exceto para o tAs encontrado.

Espécie de As	Concentração, $\mu\text{g kg}^{-1}$		RSD %	Recuperação %
	Certificado	Encontrado		
iAs	$124 \pm 11$	$123 \pm 4$	3	99
MMAs	-	$17 \pm 1$	4	-
DMAs	$119 \pm 13$	$122 \pm 4$	4	103
tAs	$260 \pm 13$	$262 \pm 3^a$	-	101

<sup>a)</sup> Calculado a partir da soma das espécies de As determinadas no CRM ERM-BC211

O CRM não possuía a concentração da espécie MMAs certificada, mas a comparação da soma das espécies de As determinadas na suspensão do CRM, com a concentração de tAs certificada, para a qual se obteve uma recuperação 101% do As total

contido no CRM, sugere que a concentração de MMAs determinada esteja em conformidade com o teor real dessa espécie de As no CRM.

### 5.1.3.2. Análise de tAs por ICP-MS

Para a determinação de As total por ICP-MS as curvas de calibração foram construídas da mesma forma nos dois equipamentos utilizados. Um branco e cinco soluções padrão aquosas, com 5% de HNO<sub>3</sub>, na faixa de concentração de 0,15 a 3,0 µg L<sup>-1</sup> de arsênio foram utilizadas na confecção da curva de calibração. As medidas foram realizadas em triplicata. Os limites de detecção e quantificação na análise de tAs por ICP-MS, foram calculados como três vezes (3σ) e dez vezes (10σ) o valor do desvio padrão de dez medidas do branco, respectivamente<sup>50</sup>. Na Tabela XV são apresentados os resultados de LOD e LOQ do método obtidos com os dois espectrômetros de massas utilizados na determinação de tAs nas amostras e CRMs.

**Tabela XV.** Limites de detecção e quantificação do método obtido para determinação de tAs em amostras de alimentos infantis por ICP-MS após digestão ácida assistida por forno de micro-ondas.

Espectrômetro de massas	µg As g <sup>-1</sup>	
	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>
NexION 300D	0,003	0,01
Agilent 7700x	0,001	0,005

<sup>a)</sup> Calculado para uma massa de 0,5 g

Para avaliar, a eficiência do procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas e a exatidão do método análise de tAs por ICP-MS, foram utilizados os CRMs de arroz, ERM-BC211 e o NIST 1568a, que possuíam teores certificados para tAs de 260 ± 13 µg kg<sup>-1</sup> e 0,29 ± 0,03 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Na Tabela XVI são apresentados os resultados de tAs obtidos, bem como os respectivos espectrômetros de massa utilizados nas análises.

**Tabela XVI.** Concentrações de tAs encontradas nos materiais de referência certificados ERM-BC211 e NIST 1568a por ICP-MS após digestão ácida assistida por micro-ondas. As concentrações são a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ .

Espectrômetro de massas	NIST 1568a <sup>a</sup>		ERM-BC211 <sup>b</sup>	
	Encontrado mg As kg <sup>-1</sup>	Recuperação %	Encontrado μg As kg <sup>-1</sup>	Recuperação %
NexION 300D	0,29 $\pm$ 0,01	100	-	-
Agilent 7700x	-	-	262,8 $\pm$ 5,3	101

<sup>a</sup>) Concentração de tAs certificada: 0,29  $\pm$  0,03 mg kg<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>) Concentração de tAs certificada: 260  $\pm$  13 μg kg<sup>-1</sup>

Como pode ser observado na Tabela XVI, os resultados obtidos não diferiram significativamente do valor certificado, indicando que o método de digestão proposto é apropriado para a decomposição das amostras de alimentos infantis. As concentrações de tAs encontradas nas amostras serão apresentadas na seção 5.1.4, juntamente, com os resultados da análise de especiação de As, possibilitando assim, uma melhor comparação das recuperações de As (balanço de massa).

#### 5.1.4. Análise das amostras de fórmulas infantis

Após a verificação da exatidão método, onde foi constatado que o procedimento de preparo da suspensão aplicado, foi eficiente e não ocasionou a conversão das espécies de As contidas no CRM, foram determinadas as concentrações das espécies de As nas 11 amostras de alimentos infantis listadas na seção 4.1.6.

Os resultados da análise de especiação química de As para as 5 amostras de MC e 6 amostras de PR, são apresentados na Tabela XVII, juntamente com os resultados de tAs obtidos por ICP-MS. Esses últimos foram utilizados no cálculo das recuperações de As nas amostras (balanço de massa), sendo considerados como os valores reais de As contidos nas amostras.

**Tabela XVII.** Resultados analíticos obtidos por HG-CT-AAS automatizado com multiatomizador para as espécies de As em amostras de alimentos infantis na forma de suspensão. As concentrações são a média  $\pm$  o desvio padrão (n = 5).

Amostra	Concentração, $\mu\text{g kg}^{-1}$				Recuperação <sup>b</sup> %
	iAs	MMAs	DMAs	tAs <sup>a</sup>	
MC1	75 $\pm$ 3	3,4 $\pm$ 0,1	67 $\pm$ 3	147 $\pm$ 2	99
MC2	65 $\pm$ 3	3,3 $\pm$ 0,1	49 $\pm$ 2	120 $\pm$ 1	98
MC3	94 $\pm$ 4	3,4 $\pm$ 0,1	36 $\pm$ 1	131 $\pm$ 9	102
MC4	99 $\pm$ 3	5,3 $\pm$ 0,2	89 $\pm$ 2	190 $\pm$ 9	102
MC5	85 $\pm$ 2	4,8 $\pm$ 0,1	48 $\pm$ 2	133 $\pm$ 6	104
PR1	45 $\pm$ 2	3,0 $\pm$ 0,1	15 $\pm$ 1	64 $\pm$ 3	98
PR2	47 $\pm$ 2	3,8 $\pm$ 0,2	54 $\pm$ 2	112 $\pm$ 7	94
PR3	63 $\pm$ 3	3,0 $\pm$ 0,2	67 $\pm$ 3	141 $\pm$ 8	94
PR4	68 $\pm$ 3	2,9 $\pm$ 0,1	74 $\pm$ 3	152 $\pm$ 5	95
PR5 <sup>c</sup>	8,3 $\pm$ 0,2	< LOQ	3,1 $\pm$ 0,2	12,8 $\pm$ 1	94
PR6 <sup>c</sup>	4,2 $\pm$ 0,1	< LOQ	1,6 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,4	106

<sup>a)</sup> Resultados obtidos por ICP-MS

<sup>b)</sup> Calculado a partir da soma das espécies de As determinadas, por HG-CT-AAS automatizado com multiatomizador, e as concentrações de tAs determinadas por ICP-MS

<sup>c)</sup> Amostras analisadas *in natura* (não-liofilizadas)

As recuperações de As (balanço de massa) obtidas com a utilização da técnica de HG-CT-AAS automatizada com multiatomizador, na análise de especiação de As em alimentos infantis na forma de suspensões, ficaram na faixa de 94-106% (Tabela XVII), o que sugere que todo o As contido nas amostras estava na forma de iAs, MMAs e DMAs. Nos trabalhos que utilizaram técnicas cromatográficas (IC, AEC ou HPLC) acopladas ao ICP-MS<sup>3,5,50,55,56</sup>, as faixas de recuperação de As foram mais variadas, sendo que Llorente-Mirandes *et al.*<sup>54</sup>, com a utilização de LC-ICP-MS, relatou uma faixa de recuperação de As de 94,6-102,2%, que é similar à encontrada nesse trabalho.

Como pode ser visto na Tabela XVII, as espécies majoritárias de As encontradas em todas as amostras de alimentos infantis analisadas foram iAs e DMAs, o que está de acordo com a literatura<sup>3,5,50,54-57</sup>. A espécie MMAs foi encontrada em baixas concentrações, sendo a espécie de As minoritária em todas as amostras analisadas. Os teores de MMAs obtidos nas amostras do tipo MC estão de acordo com as reportadas previamente por Juskelis *et al.*<sup>5</sup>. Levando em consideração a abundância relativa de iAs e DMAs em cada uma das amostras de mistura de cereais para mingau (MC), os

resultados também estão de acordo com o que é reportado em outros trabalhos<sup>3,5,50,54</sup>, sendo a concentração de iAs, majoritariamente maior que a da espécie DMAs.

Como as concentrações das espécies de As apresentadas na Tabela XV para as amostras de papinhas (PR) brasileiras (PR1-PR4), são para o extrato seco (amostras liofilizadas), esses teores foram recalculados com base no teor de umidade de cada uma das amostras. As concentrações recalculadas para as espécies majoritárias encontradas variaram de 8,3-13,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e de 2,8-13,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para iAs e DMAs, respectivamente, estando de acordo com os resultados obtidos para as amostras produzidas nos EUA (PR5 e PR6) e com a literatura<sup>56</sup>, para esse tipo de alimento infantil.

Em virtude da maior toxicidade e do que as legislações pertinentes tratam sobre o arsênio inorgânico, um maior enfoque será dado para esta espécie de As. Primeiramente, quando as concentrações de iAs encontradas para as amostras do tipo MC são comparadas, pode-se notar que as brasileiras (MC1 e MC2) possuem teores de iAs inferiores às produzidas nos EUA (MC3, MC4, MC5). Essa diferença está de acordo com o que é citado na literatura, pois é diretamente relacionada à quantidade de derivados de arroz utilizado para a produção desses alimentos, ao cultivar do arroz e ao local de plantio<sup>32</sup>. No entanto, levando-se em consideração o que determina a legislação brasileira, chinesa e europeia, todas as amostras do tipo MC analisadas estariam atendendo aos limites de 300, 150 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de iAs, respectivamente. Apesar da legislação brasileira não categorizar os alimentos infantis dentre os outros que possuem níveis máximos de iAs listados, foi possível enquadrá-los em uma categoria, levando-se em conta o seu componente majoritário, mas esse limite é três vezes maior que o novo limite introduzido pela nova legislação alimentar europeia, indicando que o assunto é atual e está em constante análise.

Apenas as amostras MC3 e MC4, produzidas nos EUA, possuem teores de iAs limítrofes, levando-se em conta a legislação europeia (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Juskelis *et al.*<sup>5</sup> analisaram 31 amostras de alimentos infantis do tipo MC produzidos nos EUA e, em 4 delas, o teor de iAs excedeu o limite, considerado seguro pela legislação europeia, das quais duas apresentaram teores superiores ao da legislação chinesa, que é de 150  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de iAs. No entanto, mesmo a amostra com a concentração de iAs mais elevada, que foi de 206  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , não atingiu o limite estabelecido pela legislação brasileira. É importante mencionar que os EUA não possuem uma legislação que estabeleça limites de iAs, ou até mesmo tAs, em alimentos.



Quando se observa as concentrações de iAs encontradas nas amostras de papinhas do tipo refeição (PR), nenhuma delas possui iAs em teores que ultrapassem os limites estabelecidos por nenhuma legislação vigente, principalmente se for levado em consideração o teor de umidade contido nessas, conforme descrito anteriormente. Isso se deve ao fato da diversidade de produtos utilizados para a produção desse tipo de alimento infantil, que inclui, por exemplo, carnes, tubérculos, legumes, vegetais e frutas que, conhecidamente, possuem baixos teores de arsênio<sup>31</sup>.

## 5.2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ENXOFRE EM ÓLEO DIESEL POR HR-CS GF MAS COM AMOSTRAGEM DIRETA

### 5.2.1. Escolha da molécula alvo e comprimento de onda

Como mencionado anteriormente, o uso do instrumento de HR-CS AAS permitiu o monitoramento de moléculas diatômicas, abrindo novas possibilidades para determinação de enxofre. Nesse sentido, embora existam diferentes moléculas alvo que podem ser monitoradas como, por exemplo, CS, SH e SnS, há um consenso nos trabalhos publicados<sup>10,21,150-157</sup> de que os melhores resultados são obtidos com a molécula de CS na determinação de S em amostras que possuem carbono em sua composição como materiais biológicos e derivados de petróleo<sup>140</sup>. Por isso, a molécula diatômica de CS foi escolhida como molécula alvo nesse trabalho. Essa molécula possui uma forte banda espectral na faixa entre 257,5 nm e 259 nm, que corresponde à sequência vibracional  $\Delta v = 0$  da transição eletrônica  $X^1\Sigma^+ \rightarrow A^1\Pi$ . Dentro da banda gerada pelo movimento vibracional é encontrado um espectro que apresenta várias linhas rotacionais finas de largura (~24 pm) similar às linhas atômicas, possibilitando, assim, o seu monitoramento por um espectrômetro de absorção atômica<sup>149</sup>. Outro fator importante, levado em consideração para a escolha dessa molécula, é a estabilidade da ligação C-S, que possui uma energia de dissociação de 714,1 kJ mol<sup>-1</sup>.

Já foi reportado o uso dos comprimentos de onda de 257,593 nm, 257,958 nm e 258,056 nm<sup>10,21,150-157</sup> para a determinação S, como CS, sendo que os dois últimos são considerados mais “sensíveis”<sup>21,150,152,155,156</sup>. Levando-se em consideração essa maior sensibilidade e o fato da linha analítica situada em 258,056 nm já ter sido utilizada na determinação de enxofre, como CS, em óleos combustíveis<sup>21</sup>, ela foi escolhida para esse trabalho.

### 5.2.2. Estudos preliminares

Na literatura existem diversos trabalhos acerca da determinação de enxofre por HR-CS GF MAS, via CS, que citam a utilização de modificadores permanentes, dentre eles pode-se citar o uso de Zr<sup>21,155</sup>, W<sup>21,156</sup>, Ti<sup>156</sup>, Ta<sup>156</sup> e Ru<sup>157</sup>. O uso do modificador permanente é recomendado para evitar o contato da amostra com o grafite do tubo e a

razão para isso, é evitar a reação competitiva entre o enxofre e o carbono que resulta na formação de dissulfeto de carbono ( $\text{CS}_2$ ), que é muito volátil e causa perdas de enxofre<sup>156</sup>.

As investigações preliminares foram realizadas em tubo para sólidos com plataforma recoberta com 400  $\mu\text{g}$  de Ir. O Ir foi escolhido, como modificador permanente, pelo seu uso ainda não ter sido reportado na técnica de HR-CS GF MAS, até o início do trabalho, e por ele já ter sido utilizado no desenvolvimento de métodos para determinação de metais em óleo cru<sup>164</sup>. Para as medidas, foi utilizado um volume de 10  $\mu\text{L}$  das amostras de óleo diesel S50, S500 e S1800. Um primeiro estudo foi realizado com o modificador em solução e temperaturas de pirólise e vaporização utilizados por Heitmann *et al.*<sup>155</sup>. Para isso, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução 2  $\text{g L}^{-1}$  de Ca + 0,02% de Triton X-100 (pipetada sobre a amostra) foi usada como modificador, totalizando uma massa de 40  $\mu\text{g}$  de Ca. As temperaturas de pirólise e vaporização utilizadas foram de 700 °C e 2400 °C, respectivamente. Durante as medidas, não foi observado sinal analítico para a amostra de diesel S50 e nas outras duas amostras, de diesel S500 e S1800, observou-se um sinal de  $A_{\text{int}}$  muito baixo.

Posteriormente, outro experimento foi realizado com as mesmas temperaturas de pirólise e vaporização utilizadas no procedimento anterior, mas dessa vez foi empregada a mistura de Pd/Mg como modificador em solução<sup>21</sup>. Para tanto, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução 2  $\text{g L}^{-1}$  de Pd + 1  $\text{g L}^{-1}$  de Mg + 0,02% de Triton X-100, equivalente a uma massa de 40  $\mu\text{g}$  de Pd + 20  $\mu\text{g}$  de Mg no forno, foram empregados. Observou-se a formação de um sinal analítico bem resolvido para as amostras de óleo diesel S500 e S1800. Para a amostra de óleo diesel S50 não foi observada a formação de sinal analítico.

Com a pipetagem manual, foi observado que a amostra se espalhava para a parte externa e alça da plataforma, o que acarretou altos desvios padrão relativos durante as medidas. Frente a isso e considerando ainda o fato da amostra ser líquida e não possuir alta viscosidade, passou-se a utilizar o amostrador líquido com tubo PIN.

### 5.2.3. Estudo de modificadores químicos

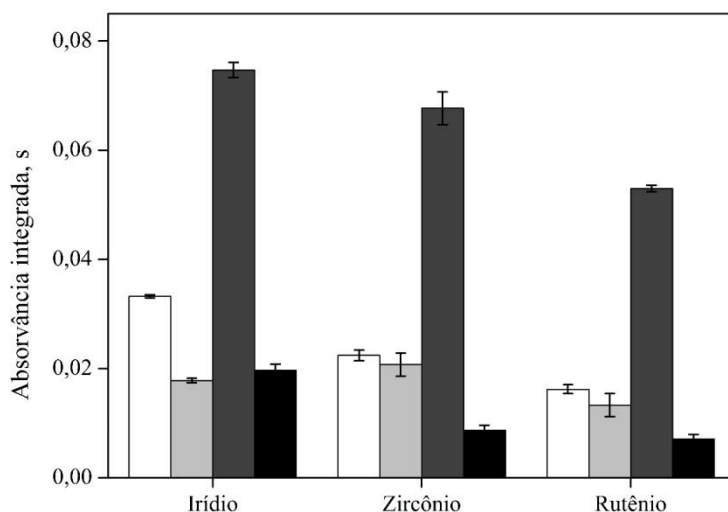
#### 5.2.3.1. Escolha dos modificadores químicos

Considerando a importância do uso de modificadores químicos para estabilização do enxofre no tubo de grafite, o uso de diferentes modificadores

permanentes (Ir, Zr e Ru) e modificadores em solução (Pd, Mg, Ca e Pd/Mg), foram investigados.

A utilização dos modificadores químicos, de um modo geral, é muito importante pois está relacionada ao tipo de amostra, bem como à composição de sua matriz e ao elemento que se deseja determinar. Sabe-se que o programa de temperatura aplicado ao forno de grafite é utilizado para fazer uma separação “*in situ*” do analito e dos concomitantes antes da etapa de atomização (em GF AAS) e vaporização (em GF MAS). Assim, elevadas temperaturas de pirólise são requeridas para que haja uma efetiva eliminação da matriz que compõe a amostra, entretanto, para que o analito não seja volatilizado durante as etapas de secagem e pirólise, os modificadores químicos são empregados<sup>135</sup>. Na literatura existem várias menções ao uso de modificadores químicos na determinação de S, como CS. Dentre os elementos citados e suas combinações destacam-se, Ca<sup>21,155</sup>, Pd<sup>156</sup>, nanopartículas de Pd<sup>157</sup> e Pd/Mg<sup>10,21</sup>.

O comportamento desses diferentes modificadores químicos foi avaliado para uma amostra de óleo diesel e duas soluções padrão de S (L-cisteína e ácido sulfâmico). A amostra de óleo diesel S500 (não-diluída) foi usada nesse estudo devido sua alta concentração de enxofre. Para escolher os modificadores químicos mais apropriados, os parâmetros levados em consideração foram: a  $A_{int}$  e o perfil do pico.



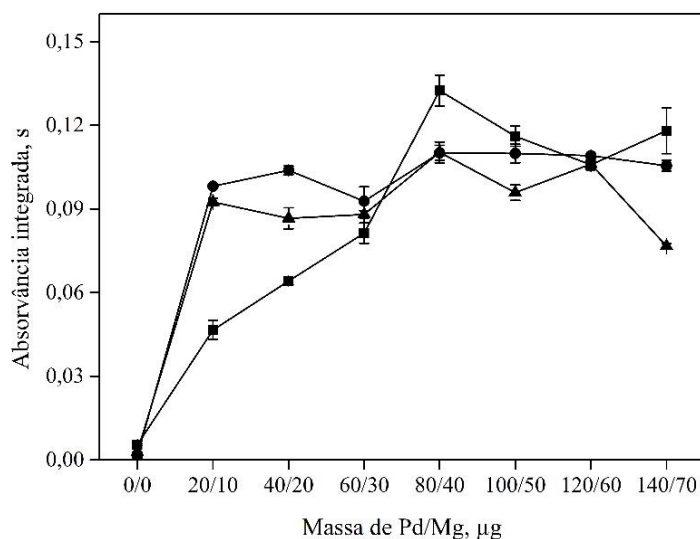
**Figura 14.** Absorvâncias integradas para 10  $\mu$ L de óleo diesel S500 usando 400  $\mu$ g de cada modificador permanente (Ir, Zr e Ru) e 40  $\mu$ g de Pd (□), 20  $\mu$ g de Mg (■), 40/20  $\mu$ g de Pd/Mg (■) e 40  $\mu$ g de Ca (■).  $T_{pir}$ : 800 °C,  $T_{vap}$ : 2500 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

Como pode ser visto na Figura 14, a  $A_{int}$  mais alta foi observada com a utilização de Ir, como modificador permanente, combinado com o uso de Pd/Mg como modificador em solução. O uso de Ir como modificador permanente, combinado ao uso de Pd, como modificador em solução, foi reportado previamente na determinação de S em amostra de alimentos, no entanto os autores não avaliaram o uso do Mg<sup>165</sup>. No presente trabalho, como pode ser visto na Figura 14, o Mg em conjunto com o Pd, desempenha uma importante função na estabilização do S presente na amostra. A forte interação entre Pd e S já é bem conhecida devido ao envenenamento de catalisadores de Pd pelo S<sup>166,167</sup>, o que explica a utilização do Pd como modificador químico. Entretanto, como pode ser visto na Figura 14, a combinação do Mg com o Pd aumenta a capacidade de estabilização do S pelo Pd, o que está de acordo com o que foi reportado por Kowalewska<sup>21</sup>. Qiao e Jackson<sup>168</sup> reportaram que o Mg faz com que o Pd se distribua mais uniformemente sobre a superfície da plataforma, favorecendo a formação de menores aglomerados de Pd, o que pode aumentar a interação entre Pd e S devido ao aumento da área de Pd exposta. Isso está de acordo com a aplicação de nanopartículas de Pd, como modificador químico, reportado recentemente por diferentes autores<sup>20,157</sup>. O uso das nanopartículas reforça a ideia de ocorrer uma melhor interação entre o modificador químico e o analito, já que sua utilização proporciona uma distribuição muito homogênea do Pd na plataforma o que acarreta na formação de uma maior área de contato para interação com a amostra devido ao pequeno tamanho das partículas. Para os padrões, os melhores resultados também foram encontrados com o uso dos mesmos modificadores químicos, portanto, a combinação de Ir, como modificador permanente, e Pd/Mg, como modificador químico em solução, foi escolhida para as etapas seguintes do trabalho.

#### 5.2.3.2. Otimização da massa de modificador químico

Após a escolha dos modificadores químicos, onde a condição Ir e Pd/Mg, como modificador permanente e modificador em solução, respectivamente, mostrou ser a ideal, foi feita a otimização da massa de Pd/Mg. Para tanto, foram realizadas medidas com óleo diesel S500 e os padrões de S que estavam sendo estudados. Como pode ser observado na Figura 15, a  $A_{int}$  mais alta para a amostra de diesel foi obtida com a utilização de 80/40  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, indicando que massas menores de Pd/Mg não são apropriadas para estabilizar o S contido na amostra. Essa massa de 80/40  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, é duas vezes maior que a utilizada por Kowalewska<sup>21</sup> e a massa

de Pd é oito vezes maior que a quantidade de nanopartículas de Pd utilizada por Nakadi *et al.*<sup>20</sup>.

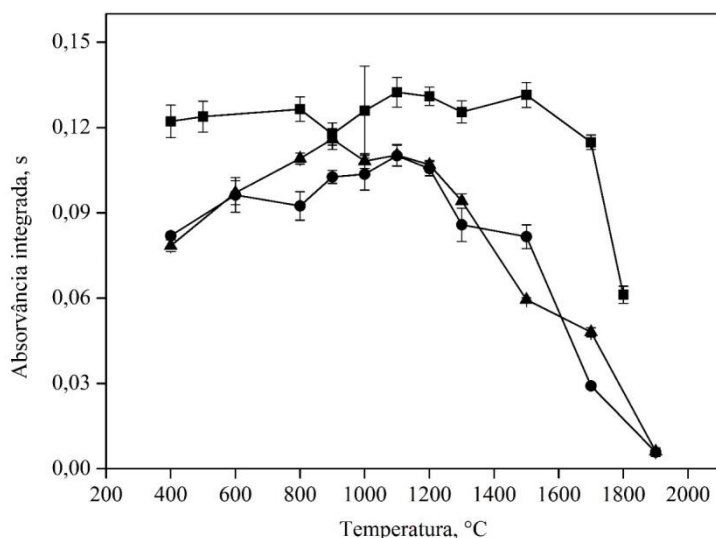


**Figura 15.** Efeito da massa do modificador químico de Pd/Mg na absorvância integrada das medidas de 20 µL dos padrões (500 ng de S) e 10 µL da amostra de óleo diesel S500, com a utilização de 400 µg de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína.  $T_{pir}$ : 800 °C,  $T_{vap}$ : 2500 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

Para os padrões as curvas evidenciam, na Figura 15, que massas menores do modificador químico de Pd/Mg são suficientes para estabilizar o S, mas o valor mais alto de  $A_{int}$  também foi obtido com a utilização da massa de 80/40 µg de Pd/Mg, respectivamente. Assim, dentre as massas de modificador químico em solução estudadas, 80/40 µg de Pd/Mg foi escolhida para confecção das curvas de pirólise e vaporização.

#### 5.2.4. Curvas de pirólise e vaporização

As curvas de pirólise foram construídas pipetando-se 20 µL da solução de modificador químico (80/40 µg de Pd/Mg, respectivamente) e 20 µL dos padrões, que possuía o equivalente a 500 ng de S. Para as medidas da amostra, foi utilizado o mesmo volume de modificador e 10 µL de óleo diesel S500. A temperatura de vaporização utilizada para confecção das curvas de pirólise foi de 2500 °C. As curvas de pirólise para os padrões e amostra são mostradas na Figura 16.

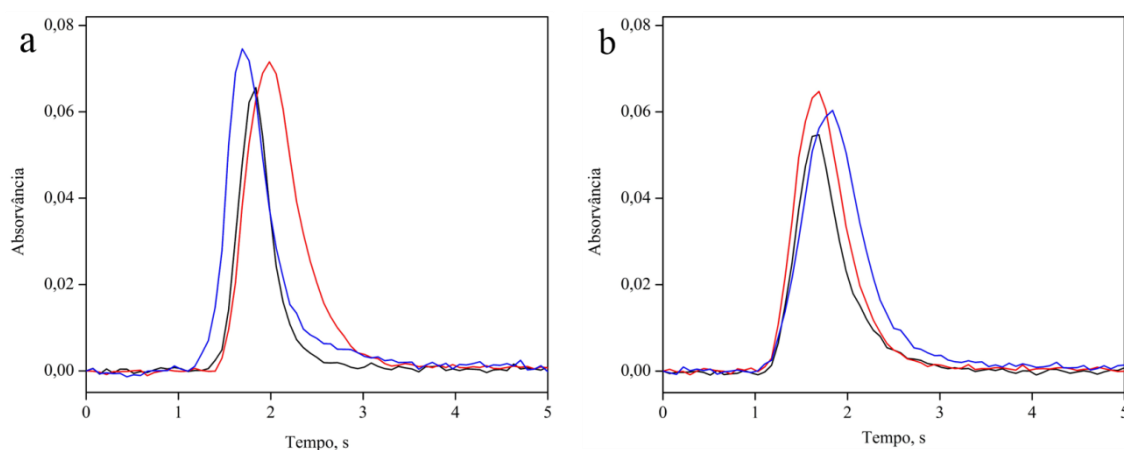


**Figura 16.** Curvas de pirólise para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu$ L da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu$ g de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu$ g de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína.  $T_{\text{vap}}$ : 2500 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

Como pode ser observado na Figura 16, a amostra de óleo diesel S500 mostrou possuir uma estabilidade térmica maior que a dos padrões de S, exibindo um patamar até a temperatura de pirólise de 1500 °C, enquanto que para os padrões os maiores valores de  $A_{\text{int}}$  são observados entre 900 e 1100 °C. Essa estabilidade térmica superior observada para a amostra pode ser atribuída ao maior teor de carbono contido na mesma, em comparação com os padrões, fato esse, que já foi relatado previamente por Ferreira *et al.*<sup>114</sup>. Além do mais, comparando-se as curvas de pirólise, para amostras de óleo diesel, reportadas por Nakadi *et al.*<sup>21</sup> e a obtida na Figura 16, observou-se que uma maior estabilidade térmica foi obtida no presente trabalho. Nakadi *et al.*<sup>21</sup> relatam uma queda abrupta de sinal, em termos de  $A_{\text{int}}$ , para temperaturas de pirólise entre 300 e 600 °C, com a utilização de nanopartículas de Pd, como modificador químico, sugerindo que o uso do modificador químico de Pd/Mg em conjunto com Ir, proporciona uma maior de estabilização do S em amostras de diesel. Os autores relatam ainda que esse fato foi observado tanto na técnica de HR-CS GF MAS, quanto na técnica de HR-CS SS-GF MAS. Além disso, o mesmo comportamento também foi relatado por Kowalewska<sup>21</sup> com a utilização de Pd/Mg, como modificador químico. A autora reportou uma acentuada queda no sinal quando temperaturas de pirólise maiores que 400 °C foram aplicadas na análise de óleo combustível residual e nas medidas de padrões orgânicos. Isso,

provavelmente, ocorreu devido à utilização da reduzida massa de Pd/Mg (16/8  $\mu\text{g}$ , respectivamente), que não foi suficiente para estabilizar o S, e como foi mencionado anteriormente, no item 2.2.3.4, não foi possível utilizar massas maiores de Pd/Mg devido à baixa solubilidade desse modificador (em base orgânica) em xileno.

Na Figura 17 são apresentados os perfis de absorvância, no CP, para os padrões e amostra de óleo diesel S500. Na Figura 17a estão os perfis de absorvância obtidos com a condição que estava sendo usada antes da confecção das curvas de pirólise, ou seja, temperatura de pirólise de 800 °C. Já na Figura 17b, estão os perfis de absorvância obtidos com a utilização da temperatura de 1100 °C, pela maior sensibilidade para a amostra de óleo diesel ter sido obtida nessa temperatura.

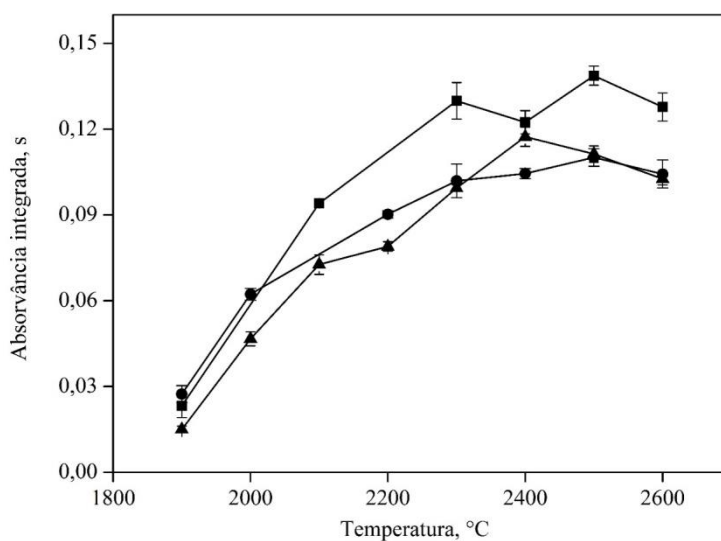


**Figura 17.** Perfis de absorvância obtidos no CP para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu\text{L}$  da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente.  $T_{\text{vap}}$ : 2500 °C. a)  $T_{\text{pir}}$ : 800 °C e b)  $T_{\text{pir}}$ : 1100 °C. (■) L-cisteína, (■) ácido sulfâmico e (■) óleo diesel S500.

Pode ser visto na Figura 17a, que a vaporização da molécula de CS, dos padrões, quando a temperatura de pirólise de 800 °C foi aplicada, ocorre temporalmente após a vaporização do CS proveniente da amostra de óleo diesel S500. Com o incremento dessa temperatura, observa-se na Figura 17b, que a vaporização se dá ao mesmo tempo, tanto para os padrões, como para o diesel, tornando os perfis de absorvância mais semelhantes. Embora os perfis fiquem ligeiramente mais largos, essa foi a condição selecionada por apresentar um maior sinal em  $A_{\text{int}}$  para a amostra. Portanto, a temperatura de pirólise adotada para as investigações futuras foi de 1100 °C.



Após fixada a temperatura de pirólise, partiu-se para otimização da temperatura de vaporização. Para tanto, foram feitas curvas de vaporização para os padrões de S e amostra de óleo diesel S500, que são mostradas na Figura 18. A temperatura de vaporização de 2500 °C apresentou os maiores valores de  $A_{\text{int}}$  para o ácido sulfâmico e para a amostra de óleo diesel S500. Para a L-cisteína, observou-se um sinal de  $A_{\text{int}}$  ligeiramente maior em 2400 °C, mas levando-se em consideração os desvios padrão das medidas, em 2400 °C e 2500 °C, essa diferença não foi significativa. Assim, a temperatura de vaporização de 2500 °C foi definida para as etapas futuras do trabalho.



**Figura 18.** Curvas de vaporização para a molécula de CS a partir dos padrões (500 ng de S) e 10  $\mu\text{L}$  da amostra de óleo diesel S500, com 80/40  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, como modificador em solução, em tubo PIN com de 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente. (■) S500, (●) ácido sulfâmico, (▲) L-cisteína.  $T_{\text{pir}}$ : 1100 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

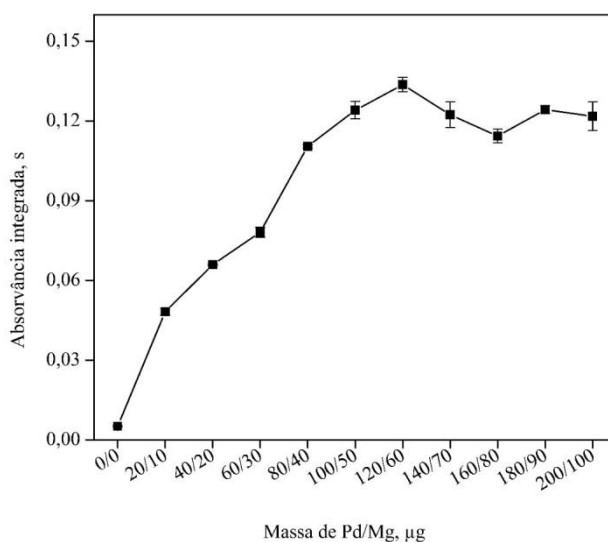
Antes de iniciar a confecção da curva de calibração e determinar os parâmetros de mérito do método, as condições obtidas para a amostra de óleo diesel S500, foram aplicadas e avaliadas na análise do CRM.

### 5.2.5. Investigações com o material de referência certificado

Como mencionado anteriormente, as condições otimizadas até o momento (modificadores químicos e temperaturas de pirólise e vaporização) foram aplicadas na análise do CRM de enxofre em óleo diesel, NIST SRM 2724b. Para isso, inicialmente,

um volume de 5  $\mu\text{L}$  do CRM foi introduzido no forno de grafite. O volume foi reduzido, em comparação com a amostra de óleo diesel S500, devido a ocorrência de alguns respingos do CRM para a parede do tubo e janelas de quartzo durante as etapas de secagem do programa de temperatura (Tabela VIII).

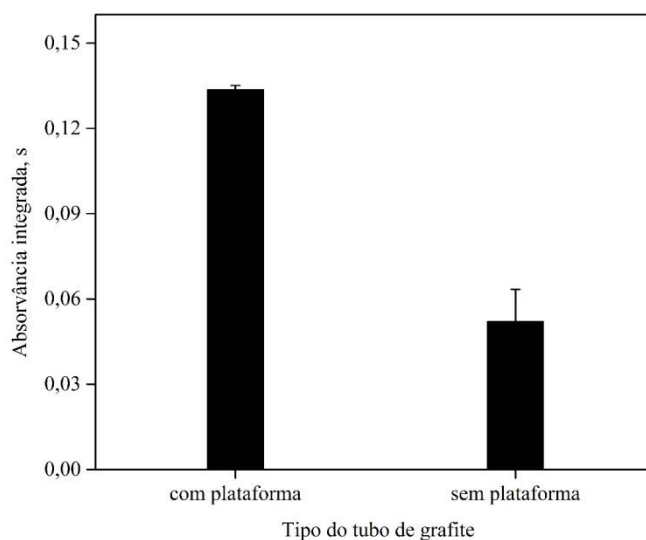
Levando em consideração o teor de enxofre certificado no CRM, os valores de  $A_{\text{int}}$  obtidos durante sua análise, foram menores que os valores esperados. Frente a isso, diferentes estratégias foram investigadas objetivando alcançar o valor de enxofre certificado no CRM. A primeira variável otimizada para o CRM foi a massa de modificador químico em solução (Pd/Mg) e, como pode ser visto na Figura 19, a melhor sensibilidade, isto é, o valor de absorvância integrada mais alto foi obtido com a massa de 120/60  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, entretanto, se alcançou apenas 28% do valor de S certificado.



**Figura 19.** Efeito da massa do modificador químico de Pd/Mg na absorvância integrada das medidas de 5  $\mu\text{L}$  do material de referência certificado SRM NIST 2724b, com a utilização de 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente.  $T_{\text{pir}}$ : 800  $^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{vap}}$ : 2500  $^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

Considerando a hipótese de que o valor de S certificado no CRM não havia sido atingido devido a possíveis perdas de compostos de enxofre voláteis nas etapas que precederam a etapa de vaporização da molécula de CS, a temperatura de pirólise foi reduzida de 1100  $^{\circ}\text{C}$  para 400  $^{\circ}\text{C}$ , mas os valores de  $A_{\text{int}}$  obtidos foram praticamente os mesmos para ambas as temperaturas.

O próximo passo, foi a substituição do tubo com plataforma PIN por um tubo sem plataforma no sentido de verificar se a maior área de contato da parede do tubo promoveria uma maior interação Pd-S, prevenindo assim perdas dos compostos voláteis de S contidos no CRM. Para esse experimento utilizou-se um tubo sem plataforma com os mesmos modificadores químicos usados previamente (400  $\mu\text{g}$  de Ir e 120/60  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente) e foi aplicado o programa de temperatura que consta na Tabela IX. No entanto, como pode ser visto na Figura 20, o valor de  $A_{\text{int}}$  obtido nesse experimento, com a utilização do tubo sem plataforma, foi menor que valor obtido com a utilização do tubo com plataforma PIN. Frente a isso, descartou-se a utilização de tubos sem plataforma PIN.



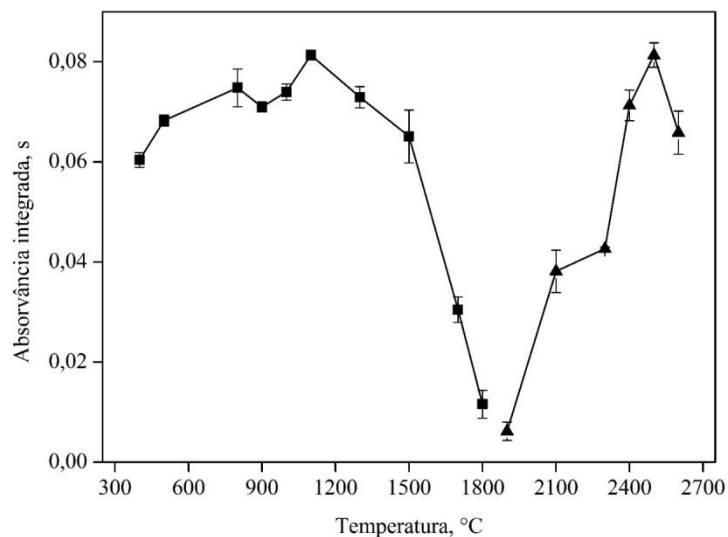
**Figura 20.** Absorvâncias integradas obtidas na análise de 5  $\mu\text{L}$  do material de referência certificado de enxofre em óleo diesel NIST 2724b em tubos de grafite com e sem plataforma integrada, com a utilização 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente e 120/60  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução.  $T_{\text{pir}}$ : 1100  $^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{vap}}$ : 2500  $^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas ( $n = 3$ ).

Ainda levando em consideração a interação Pd-S, observou-se que quando o volume de CRM injetado no tubo de grafite com plataforma PIN foi diminuído de 5  $\mu\text{L}$  para 2  $\mu\text{L}$ , houve um aumento na recuperação do S de 28% (5  $\mu\text{L}$ ) para 45% (2  $\mu\text{L}$ ) do valor certificado. Baseado nesses resultados foi testada a estratégia de diluir o CRM de óleo diesel, com intuito de inserir massas ainda menores de CRM no tubo de grafite. No

experimento foram utilizados as massas de modificadores químicos e o programa de temperatura otimizados para o tubo com plataforma PIN.

As concentrações das soluções testadas foram de 0,05, 0,125 e 0,25 kg L<sup>-1</sup> do CRM diluído em 1-propanol. Como resultado dessa diluição, se obteve três soluções homogêneas, das quais se utilizou um volume de 10 µL para a análise. Boas recuperações de enxofre foram obtidas com o uso das soluções com concentração de 0,05 e 0,125 kg L<sup>-1</sup> de CRM em 1-propanol, a única diferença entre os resultados dessas duas soluções foi que o desvio padrão das medidas foi maior para a solução que continha uma menor massa do CRM (0,05 kg L<sup>-1</sup>). Isso sugere que a diluição do CRM no álcool melhorou a interação do S, contido no óleo diesel, com o Pd, provavelmente devido a uma melhor distribuição/espalhamento da amostra sobre a plataforma do tubo de grafite.

Após essas observações, de que a amostra deve ser diluída para ser inserida no tubo de grafite, novas curvas de pirólise e vaporização para a amostra de óleo diesel S500 foram construídas. Para isso, foi preparada uma solução com concentração de 0,125 kg L<sup>-1</sup> de óleo diesel S500 em 1-propanol para confecção dessas curvas que são apresentadas na Figura 21.

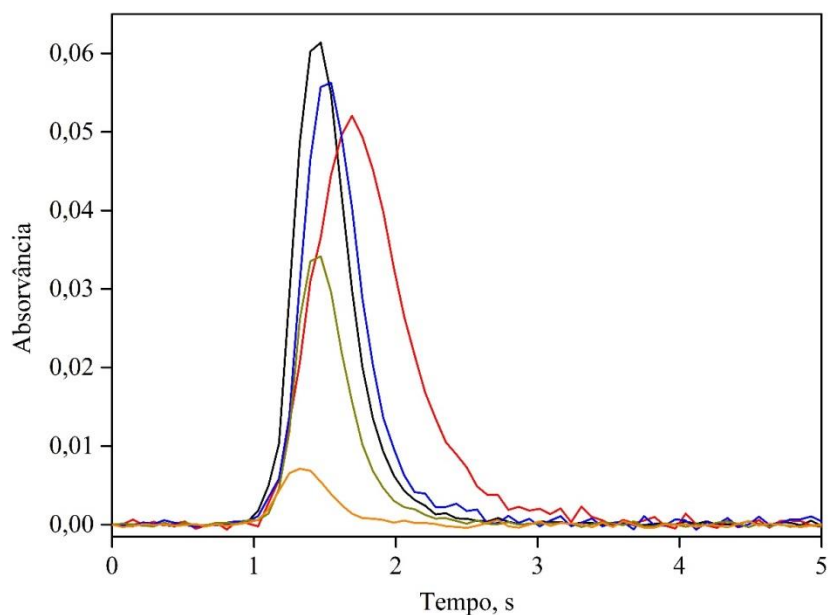


**Figura 21.** Curvas de pirólise (■) e vaporização (▲) para molécula de CS a partir de 10 µL de uma solução 0,125 kg L<sup>-1</sup> de óleo diesel S500 em 1-propanol, com a utilização 400 µg de Ir, como modificador permanente e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução. T<sub>vap</sub>: 2500 °C, para a curva de pirólise e T<sub>pir</sub>: 1100 °C, para a curva de vaporização. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medidas (n = 3).

Pode-se observar na curva de pirólise da amostra diluída (Figura 21) que a estabilidade térmica diminuiu quando comparada com a amostra não-diluída (Figura 16), o que está de acordo com o que foi discutido anteriormente a respeito da relação da estabilidade térmica com a quantidade de carbono inserida no tubo de grafite. As melhores temperaturas para pirólise e vaporização da amostra diluída foram 1100 °C e 2500 °C, respectivamente, que são as mesmas definidas anteriormente para a amostra não-diluída e padrões.

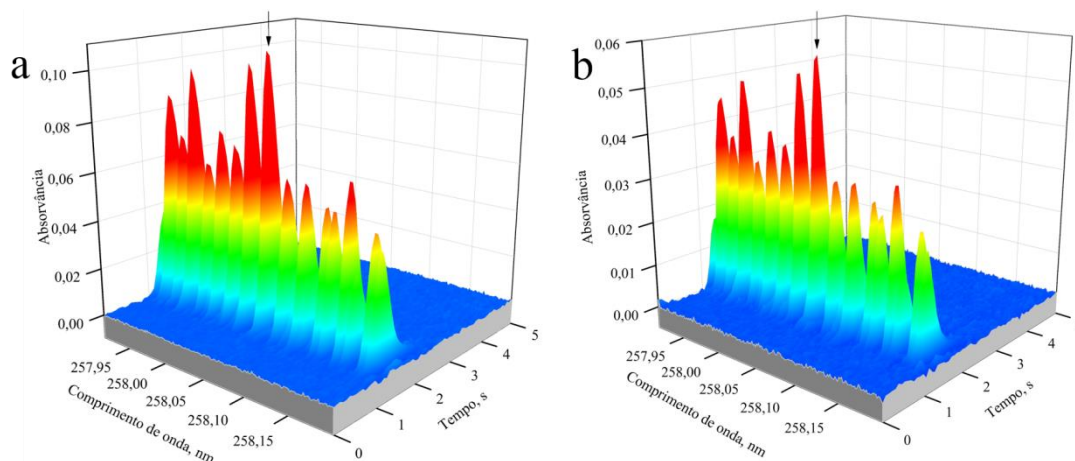
#### 5.2.6. Escolha do padrão de enxofre

Dois compostos de enxofre foram investigados como padrões nesse estudo, a L-cisteína ( $C_3H_7NO_2S$ ) e o ácido sulfâmico ( $H_3NSO_3$ ), ambos em soluções aquosas. No início do trabalho foi utilizada a DL-cisteína, mas essa substância foi substituída pela L-cisteína devido a problemas relacionados com sua solubilidade em água. Conforme mencionado no item 4.2.5, o modificador químico em solução (Pd/Mg) foi injetado, no tubo de grafite, juntamente com as soluções padrão, durante suas medidas. O procedimento utilizado na análise das amostras e CRM, que consistia na secagem prévia do modificador químico em solução, também foi testado e os resultados obtidos em ambos os procedimentos (injetando juntamente e secando previamente o modificador) forneceram os mesmos resultados em termos de  $A_{int}$ . Dessa forma, o primeiro procedimento de injeção do modificador juntamente com a solução padrão, foi escolhido devido ao menor tempo de análise. Os dois padrões investigados apresentaram sensibilidades semelhantes, mas o perfil do pico obtido com a L-cisteína se mostrou mais similar aos do CRM e das amostras de diesel S500 e S10, como pode ser observado na Figura 22.



**Figura 22.** Perfis de absorvância resolvidos no tempo para molécula de CS no comprimento de onda de 258,056 nm para a (■) L-cisteína, (■) ácido sulfâmico, (■) CRM SRM 2724b, (■) diesel S500 e (■) diesel S10, com a utilização 400  $\mu\text{g}$  de Ir, como modificador permanente e 120/60  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução.  $T_{\text{pir}}$ : 1100  $^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{vap}}$ : 2500  $^{\circ}\text{C}$ . L-cisteína (500 ng S) e soluções com 0,125  $\text{kg L}^{-1}$  do CRM SRM 2724b, 0,125  $\text{kg L}^{-1}$  de óleo diesel S500 e 0,250  $\text{kg L}^{-1}$  de óleo diesel S10 em 1-propanol.

Esta similaridade também pode ser observada quando são comparados os espectros de absorção molecular resolvidos temporalmente, da molécula de CS, obtidos com a amostra de óleo diesel S500 diluída em 1-propanol (Figura 23a) e a L-cisteína (Figura 23b). Pode-se observar na Figura 23 que o S contido na L-cisteína e no óleo diesel possuem um comportamento térmico semelhante, isto é, ambas as moléculas são vaporizadas no mesmo intervalo de tempo, entre 1 e 2 s, aproximadamente. O que reforça a viabilidade do uso da L-cisteína, em solução aquosa, como padrão de enxofre na análise de amostras de óleo diesel. Por esta razão, a L-cisteína foi utilizada para confecção da curva de calibração.



**Figura 23.** Espectro de absorção molecular, resolvido temporalmente, da molécula de CS, obtido da (a) solução padrão aquosa de L-cisteína (500 ng S) e de (b) 10 µL de uma solução 0,125 kg L<sup>-1</sup> de óleo diesel S500 em 1-propanol. Medidas realizadas em tubo de grafite PIN com 400 µg de Ir e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente. As setas indicam o comprimento de onda de 258,056 nm. T<sub>pir</sub>: 1100 °C e T<sub>vap</sub>: 2500 °C.

### 5.2.7. Parâmetros de mérito

A curva de calibração foi construída com soluções padrão aquosas de L-cisteína. foi utilizado um branco e oito soluções padrão na faixa de concentração de 6,25 a 100 mg L<sup>-1</sup> de S, correspondendo a massas de 125 a 2000 ng de S, em um tubo de grafite com plataforma PIN. O volume dos padrões e modificador químico, bem como o procedimento que foi utilizado é descrito na seção 4.2.5. Foi utilizado 400 µg de Ir, como modificador permanente, e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente, como modificador químico em solução. O programa de temperatura que foi aplicado é apresentado na Tabela VIII. Os parâmetros de mérito calculados com a utilização da L-cisteína estão expressos na Tabela XVIII.

**Tabela XVIII.** Parâmetros de mérito obtidos com a solução de L-cisteína para calibração na determinação de S, como CS, por HR-CS GF MAS usando 400 µg de Ir e 120/60 µg de Pd/Mg, respectivamente, como modificadores químicos.

Parâmetro	$\lambda = 258,056 \text{ nm (CP } \pm 1)$
Equação da reta	$A_{\text{int}} = 0,0014 + 0,2165 \text{ m } (\mu\text{g})$
Coefficiente de correlação (R)	0,9996
Faixa de trabalho	12-2000 ng
$m_0$	$17 \pm 3 \text{ ng}^{\text{a}}$
LOD	$3,6 \text{ ng}^{\text{b}} / 1,4 \text{ mg kg}^{-1 \text{ c}}$
LOQ	$12 \text{ ng}^{\text{b}} / 4,7 \text{ mg kg}^{-1 \text{ c}}$

<sup>a)</sup> Média  $\pm$  desvio padrão combinado (n = 24)

<sup>b)</sup> Absoluto

<sup>c)</sup> Calculado para 2,5 mg de amostra.

O limite de detecção e o limite de quantificação relativos foram calculados para uma massa de 2,5 mg de amostra, que foi a massa de óleo diesel S10 contida em 10 µL da amostra diluída injetada no tubo de grafite.

Foi montada uma carta controle a partir do monitoramento, por 24 dias, do padrão de L-cisteína. Esses resultados foram utilizados para o cálculo da  $m_0$ , bem como, o seu desvio padrão. A  $m_0$  obtida foi maior que a calculada por Kowalewska<sup>21</sup>, que foi de 12 ng. No entanto, o LOD obtido nesse trabalho foi, aproximadamente, 4 vezes menor que os 14 ng reportado pela autora. Comparando o LOD apresentado na Tabela XVIII com os relatados por Nakadi et al.<sup>20</sup>, ele foi, aproximadamente, 85 e 2 vezes menor que os encontrados para os métodos com a utilização de emulsão alcoólica e de análise direta de diesel, respectivamente.

### 5.2.8. Verificação da exatidão do método

O valor da concentração de enxofre obtida para o CRM SRM 2724b, utilizando a técnica de HR-CS GF MAS e soluções padrão aquosas para calibração, são apresentados na Tabela XIX. Pode-se observar que o valor obtido é concordante com o valor certificado, demonstrando uma boa exatidão do método proposto. O resultado encontrado, também, confirma que soluções padrão aquosas podem ser aplicadas para a calibração na determinação de enxofre em amostras de óleo diesel por HR-CS GF MAS, utilizando o método proposto.



**Tabela XIX.** Resultado obtido para determinação de enxofre no CRM SRM 2724b diluído em 1-propanol ( $0,125 \text{ kg L}^{-1}$ ), por HR-CS GF MAS com calibração feita com solução padrão aquosa de L-cisteína em tubo de grafite PIN com  $400 \mu\text{g}$  de Ir e  $120/60 \mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente.  $T_{\text{pir}}: 1100 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{vap}}: 2500 \text{ }^\circ\text{C}$ .

CRM	Valor certificado $\text{mg kg}^{-1}$	Valor encontrado <sup>a</sup> $\text{mg kg}^{-1}$	RSD %
SRM 2724b <sup>b</sup>	$426,5 \pm 5,7$	$416,1 \pm 11,5$	2,8

<sup>a</sup>) Média de dois conjuntos de medidas com  $n = 3$  em cada  $\pm$  desvio padrão combinado

<sup>b</sup>) Diluição de  $0,125 \text{ kg L}^{-1}$  de SRM 2724b em 1-propanol

### 5.2.9. Análise das amostras de óleo diesel

Após a verificação da exatidão, o método proposto foi aplicado na determinação de enxofre em quatro amostras de óleo diesel, duas com o teor máximo de enxofre de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  (S500-A e S500-B), e outras duas com teor máximo de enxofre de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (S10-A e S10-B). Os resultados dessa determinação são apresentados na Tabela XX.

**Tabela XX.** Determinação de enxofre em amostras de óleo diesel diluídas em 1-propanol em tubo de grafite PIN usando  $400 \mu\text{g}$  de Ir e  $120/60 \mu\text{g}$  de Pd/Mg, respectivamente, como modificadores químicos, por HR-CS GF MAS e valores de referência para amostras de óleo diesel S10 determinados pelo método ASTM D 5453:2012.  $T_{\text{pir}}: 1100 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{vap}}: 2500 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Amostra	Concentração de enxofre, $\text{mg kg}^{-1}$		RSD
	HR-CS GF MAS	ASTM 5453	
S500-A <sup>a</sup>	$161 \pm 5$	—	2,8
S500-B <sup>a</sup>	$119 \pm 6$	—	4,7
S10-A <sup>b</sup>	$7,2 \pm 0,5$	6,9	7,0
S10-B <sup>b</sup>	$5,6 \pm 0,7$	5,6	12

<sup>a</sup>) Diluição de  $0,125 \text{ kg L}^{-1}$  da amostra em 1-propanol

<sup>b</sup>) Diluição de  $0,250 \text{ kg L}^{-1}$  da amostra em 1-propanol

Durante as análises, o sinal em  $A_{\text{int}}$  das amostras de óleo diesel S10 obtidas foram muito baixas (aproximadamente  $0,01 \text{ s}$ ) utilizando-se a concentração de  $0,125 \text{ kg L}^{-1}$  da amostra em 1-propanol. Assim, para a análise dessas amostras, a concentração foi elevada para  $0,25 \text{ kg L}^{-1}$  da amostra de óleo diesel S10 em 1-propanol. Os valores encontrados para a concentração de enxofre nas amostras S10-A e S10-B empregando a técnica de

HR-CS GF MAS foram comparados com os resultados informados pelo CECOM-UFRGS, que foram obtidos através do método ASTM D 5453:2012. Os resultados encontrados com as duas técnicas foram concordantes para as duas amostras, mostrando que soluções com maiores concentrações de óleo diesel em 1-propanol podem ser empregadas, ao menos, para amostras de óleo diesel com baixas concentrações de enxofre, como os ULSD.

Os resultados concordantes para as amostras de óleo diesel S10, com a utilização de uma concentração de  $0,25 \text{ kg L}^{-1}$  da amostra em 1-propanol, sugerem que existe alguma limitação na massa de enxofre que pode ser estabilizada no tubo de grafite, já que na medida do CRM e óleo diesel S500, a utilização dessa concentração ( $0,25 \text{ kg L}^{-1}$ ) em 1-propanol não apresentou resultados satisfatórios. Para confirmar essa observação, testes de recuperação foram realizados com a adição, dentro do tubo de grafite, de  $0,25 \mu\text{g}$  de enxofre (solução padrão de L-cisteína) sobre  $10 \mu\text{L}$  da amostra de óleo diesel S500 (não-diluída). As recuperações de enxofre ficaram entre 97 e 102%, confirmando que não houve efeito de matriz. Reunindo essas observações com as obtidas na otimização da massa de modificador químico em solução, onde o aumento da massa de Pd/Mg não promoveu o aumento da  $A_{\text{int}}$  para o CRM e a amostra de óleo diesel S500, parece que existem algumas limitações na massa de enxofre da amostra que interage com o Pd/Mg e é, conseqüentemente, estabilizado.

Considerando o que foi exposto, para amostras com teores desconhecidos de enxofre, é prudente usar uma baixa concentração de óleo diesel na solução com 1-propanol ( $0,125 \text{ kg L}^{-1}$ ) e em caso de não haver sinal analítico de CS ou se o sinal for muito baixo, a concentração pode ser aumentada para  $0,25 \text{ kg L}^{-1}$  de óleo diesel na solução com o álcool.

Na Tabela XX pôde-se observar que os valores dos desvios padrão para as medidas de óleo diesel S10 foram relativamente altos, principalmente para a amostra de óleo S10-B. Isso provavelmente ocorreu em virtude de a concentração de enxofre nessa amostra estar próxima do LOQ.

#### **5.2.10. Observações sobre a rotina analítica**

A cada cem queimas o recobrimento de Ir da plataforma do tubo PIN era assegurado pela adição de um adicional de  $40 \mu\text{g}$  de Ir. Para isso era utilizado o programa de temperatura apresentado na Tabela X.

O tempo de utilização do tubo de grafite foi de aproximadamente 350 queimas. Os mesmos não apresentaram rachaduras nem quebraram durante a análise das amostras de óleo diesel, mas um considerável desgaste foi observado na parte externa do tubo, ao redor do orifício de amostragem. Esse desgaste ocasionou uma diminuição do sinal analítico para o CS durante as análises.

## 6. CONCLUSÕES

Uma redução significativa das etapas envolvidas no preparo das amostras de alimentos infantis na análise de especiação química de As, por HG-CT AAS automatizado, e na determinação indireta de S em óleo diesel, por HR-CS GF MAS, foi alcançada, quando comparada às etapas empregadas nos métodos de preparo de amostra mais utilizados (extração e emulsão/micro-emulsão). Ademais, o tempo necessário para a medida das amostras de alimentos infantis na forma de suspensão, com a técnica de HG-CT-AAS, é inferior aos despendidos com a técnica de HPLC-ICP-MS. No caso do óleo diesel, o procedimento de diluição das amostras consumiu um tempo inferior aos utilizados nas técnicas de preparo de emulsão/micro-emulsão, empregados para amostras de combustíveis com a técnica de AAS.

O emprego da amostragem em suspensão possibilitou a separação e detecção adequada e confiável de três espécies de As (iAs, MMAs e DMAs) contidas nas amostras de alimentos infantis analisadas por HG-CT-AAS automatizado e multiatomizador. Além do mais, o método de preparo de suspensão foi eficiente e não ocasionou a conversão das espécies de As, o que foi comprovado pela análise do CRM de arroz. O uso do HCl 3 mol L<sup>-1</sup>, combinado com aquecimento e agitação ultrassônica, foi o procedimento mais adequado para o preparo da suspensão. Além disso, o método possui uma boa reprodutibilidade entre as medidas e os valores de LOD e LOQ foram satisfatórios para a análise de especiação de iAs, MMAs e DMAs, atendendo os limites das legislações vigentes. Dessa forma, o método proposto, por ser de baixo custo, relativamente simples e exato, se apresenta como uma excelente alternativa às técnicas mais utilizadas para esse fim, como o HPLC-ICP-MS.

As espécies iAs e DMAs foram majoritárias nas amostras analisadas, já o MMAs foi encontrado em menores quantidades, concordando com a literatura. Dentre as espécies detectadas, o iAs, que é a mais tóxica, foi predominante nas amostras do tipo mistura de cereais para preparo de mingau e foi encontrada em menores quantidades nas amostras de papinhas do tipo refeição. Os valores de iAs determinados nas amostras analisadas nesse trabalho ficaram abaixo do limite permitido pelas legislações brasileira, europeia e chinesa, vigentes.

Com a utilização da técnica de HR-CS GF MAS, na determinação indireta de S, uma simples diluição da amostra de óleo diesel, com o 1-propanol, foi suficiente para fornecer resultados confiáveis. A análise direta da amostra após a diluição com o álcool, minimizou drasticamente o número de etapas operacionais que seriam empregadas se um método de preparo de amostra como a emulsão/micro-emulsão, fosse utilizado. Os resultados sugerem que a diluição da amostra fez com que houvesse uma maior interação entre o Pd e o S, pela melhor distribuição/espalhamento da amostra sobre a plataforma do tubo de grafite.

A mistura de Pd/Mg, empregada como modificador químico, combinada ao uso de Ir como modificador permanente foi eficiente na estabilização do S possibilitando que altas temperaturas de pirólise pudessem ser aplicadas, temperaturas essas, superiores que as reportadas com a utilização de nanopartículas de Pd como modificador químico<sup>20</sup>.

O método desenvolvido é relativamente simples e, além do mais, soluções padrão aquosas puderam ser empregadas para a confecção da curva de calibração. A L-cisteína mostrou ser a substância mais indicada, dentre as avaliadas, para ser utilizada como padrão de S.

Os resultados obtidos demonstraram que o método desenvolvido é exato uma vez que o teor de enxofre encontrado no CRM e nas amostras que possuíam a concentração de enxofre determinada pelo método padrão ASTM 5453:2012, foram concordantes. Uma boa precisão foi obtida para o método, pois para as medidas do padrão, análise do CRM e amostras de óleo diesel S500, os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 4%. Apenas para as amostras de óleo diesel S10, que o desvio padrão relativo extrapolou os 5%, em virtude de o teor de enxofre nessas amostras estarem próximos do LOQ. O LOD obtido nesse trabalho permite a determinação de enxofre em óleos diesel com teores ultrabaixos desse elemento, como o óleo diesel S10 brasileiro. Óleos diesel com diferentes concentrações de enxofre podem ser analisados com o método proposto a partir da variação da concentração da amostra na solução com 1-propanol.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Nóbrega, J.A.; Santos, M.C.; de Sousa, R.A.; Cadore, S.; Barnes, R.M.; Tatro, M.; Sample preparation in alkaline media; *Spectrochim. Acta Part B* **2006**, *61*, 465.
2. Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, *65*, 122.
3. Meharg, A.A.; Sun, G.; Williams, P.N.; Adomako, E.; Deacon, C.; Zhu, Y.-G.; Feldmann, J.; Raab, A; *Environ Pollut.* **2008**, *152*, 746.
4. Rintala, E.M.; Ekholm, P.; Koivisto, P.; Peltonem, K.; Venäläinen, E.R.; *Food Chem.* **2014**, *150*, 199.
5. Juskelis, R.; Li, W.; Nelson, J.; Cappozzo, J.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10670.
6. Dědina, J.; Tsalev, D.L.; *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*; John Wiley & Sons Inc.: Chichester, 1995.
7. Cava-Montesinos, P.; Cervera, M.L.; Pastor, A.; Guardia, M.; *Talanta* **2004**, *62*, 175.
8. Magalhães, C.E.C.; Arruda, M.A.Z.; *Química Nova* **1998**, *21*, 459.
9. Korn, M.G.A.; Santos, D.S.S.; Welz, B.; Vale, M.G.R.; Teixeira, A.P.; Lima, D.C.; Ferreira, S.L.C.; *Talanta* **2007**, *73*, 1.
10. Mior, R.; Morés, S.; Welz, B.; Carasek, E.; Andrade, J. B.; *Talanta* **2013**, *106*, 368.
11. Manahan, S.E.; *Química Ambiental*; Bookman: Porto Alegre, 2013.
12. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP n° 50, de 23/12/2013.
13. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 4294-03: Standard test method for sulfur in petroleum and petroleum products by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry*, 2003.
14. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 7212-13. Standard test method for low sulfur in automotive fuels by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry using low-background proportional counter*, 2013.
15. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 7220-12. Standard test method for sulfur in automotive, heating and jet fuels by polarization X-ray fluorescence spectrometry*, 2012.
16. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 2622-10: Standard test method for sulfur in petroleum products by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry*, 2010.

17. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 7039-13: Standard test method for sulfur in gasoline, diesel fuel, jet fuel, kerosene, biodiesel, biodiesel blends and gasoline-ethanol blends by monochromatic wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry*, 2013.
18. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D 5453-12: Standard test method for determination of total sulfur in light hydrocarbons, motor fuels and oils by ultraviolet fluorescence*, 2012.
19. <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D20133~.pdf>. Acessado em: 17/02/2016.
20. Nakadi, A.L.; Soares, C.; Veiga, M.A.M.S.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2014**, *29*, 1871.
21. Kowalewska, Z.; *Spectrochim. Acta Part B* **2011**, *66*, 546.
22. Abdul, K.S.M.; Jayasinghe, S.S.; Chandana, E.P.S.; Jayasumana, C.; Silva, P.M.C.S.; *Environ. Toxicol. Pharm.* **2015**, *40*, 828.
23. Oga, S.; Camargo, M.M.A.; Batistuzzo, J.A.O.; *Fundamentos de Toxicologia*; Atheneu: São Paulo, 2014.
24. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Gieter, B.; Smedts, B.; Meert, C.; Bisschop, H.C.; Morabito, R.; Quevauviller, P.; *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 1.
25. Maher, W.A.; Ellwood, M.J.; Krikowa, F.; Raber, G.; Foster; *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30*, 2129.
26. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K.; *Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine & occupational health*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2005.
27. International Agency for Research on Cancer (IARC); *Arsenic and Arsenic Compounds*; IARC Monographies, 2004.
28. Ljung, Karin; Palm, B.; Grandér, M.; Vahter, M.; *Food Chem.* **2011**, *127*, 943.
29. Juhasz, A.L.; Smith, E.; Weber, J.; Rees, M.; Rofe, A.; Kuchel, T.; Sansom, L.; Naidu, R.; *Environ. Health Persp.* **2006**, *114*, 1826.
30. EFSA CONTAM Panel; Scientific Opinion on Arsenic in Food; EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain; *EFSA Journal* **2009**, *7*, 1351.
31. WHO; *Chemical hazards in drinking-water: Arsenic*; World Health Organization, Geneva, 2011. Disponível em: [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/arsenic/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/arsenic/en/). Acessado em 06/03/2016.

32. Munera-Picazo, S.; Ramírez-Gandolfo, A.; Cascio, C.; Castaño-Iglesias, C.; Sgnes-Pastor, A.J.; Burló, F.; Haris, P.I.; Carbonell-Barrachina, A.A.; In *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*; Watson, R.R.; Preedy, V.R.; Zibadi, S. (Edt); Elsevier – Academic Press: Amsterdam, 2014.
33. Meharg, A.A.; Zhao, F.J.; *Arsenic & Rice*; Springer: Dordrecht, 2012.
34. Signes-Pastor, A.J.; Mitra, K.; Sarkhel, S.; Hobbes, M.; Burlo, F.; Groot, W.T.; Carbonell-Barrachina, A.A.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9469.
35. ANVISA; Resolução RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, 2013.
36. WHO; Food Additives Series 18; World Health Organization, Geneva, 1983.
37. UE; Regulamento (UE) 2015/1006; União Europeia; Jornal Oficial da União Europeia, 25/06/2015.
38. EPA; Technical Fact Sheet: final rule for As in drinking water; Environmental Protection Agency, USA, 2001.
39. USDA; Foreign Agricultural Service Global Agriculture Information Network Report CH6064. Peoples Republic of China, FAIRS, Product Specific Maximum Levels of Contaminants in Foods.
40. WHO; *Nutrient Adequacy of Exclusive Breastfeeding for the Term Infant During the First Six Months of Life*; World Health Organization, Geneva, 2002.
41. WHO; *Infant and Young Child Feeding*; World Health Organization, Geneva, 2009.
42. ANVISA; *Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e Crianças de 1ª Infância (NBCAL)*; Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/propaganda/cartilha\\_nbcalf.pdf](http://www.anvisa.gov.br/propaganda/cartilha_nbcalf.pdf) . Acessado em: 07/03/2016.
43. Menella, J.A.; Ziegler, P.; Briefel, R.; Novak, T.; *J. Am. Diet. Assoc.* **2006**, *106*, 96.
44. Carbonell-Barrachina, A.A.; Burló, F.; Burgos-Hernandez, A.; López, E.; Mataix, J.; *Sci. Hort.* **1997**, *71*, 167.
45. Gibson, R.S; Gage, L.A.; *Sci. Total Environ.* **1982**, *26*, 33.
46. FSA; Arsenic in rice; United Kingdom Food Safety Authority, 2016. Disponível em: [www.food.gov.uk/science/arsenic-in-rice](http://www.food.gov.uk/science/arsenic-in-rice) . Acessado em 26/01/2016.
47. WHO; *Water Sanitation and Health Guidelines for Drinking-water Quality*; Second Edition; World Health Organization, Geneva, 1993.
48. FAO/WHO; *Evaluation of Certain Contaminants in Food*; Joint of Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Expert Committee on Food Additives; WHO Technical Report Series (nº 959), Geneva, 2011.



49. Burló, F.; Ramírez-Gandolfo, A.; Signes-Pastor, A.J.; Haris, P.I.; Carbonell-Barrachina, A.A.; *J. Food Sci.* **2012**, *77*, T15.
50. Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; Centrich, F.; Rubio, R.; López-Sánchez; *Food Chem.* **2014**, *147*, 377.
51. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/L03540.html> . Acessado em: 10/03/2016.
52. Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.-G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H.P.; Lobinski, R.; *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1453.
53. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B.M.; Drobná, Z.; Thomas, D.J.; Stýblo, M.; Dědina, J.; *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 396.
54. Llorente-Mirandes, T.; Calderón, J.; López-Sánchez, J.F.; Centrich, F.; Rubio, R.; *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 225.
55. Jackson, B.P.; Taylor, V.F.; Punshon, T.; Cottingham, K.L.; *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 215.
56. Carbonell-Barrachina, A.A.; Xiangchun, W.; Ramírez-Gandolfo, A.; Norton, G.J.; Burló, F.; Deacon, C.; Meharg, A.A.; *Environ. Pollut.* **2012**, *163*, 77.
57. Matos-Reyes, M.N.; Cervera, M.L.; Campos, R.C.; de la Guardia, M.; *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, *62*, 1078.
58. López-García, I.; Briceño, M.; Hernández-Córdoba, M.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 11.
59. Meharg, A.A.; Lombi, E.; Williams, P.N.; Sheckel, K.G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhu, Y.; Islam, R.; *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1051.
60. Matusiewicz, H.; *Appl. Spectrosc. Rev.* **2003**, *38*, 263.
61. Holak, W.; *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 1712.
62. Dědina, J.; In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R.A. (Ed.); John Wiley & Sons: Nova Jersey, 2010, p 1.
63. Sturgeon, R.E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 733.
64. Sturgeon, R.E.; Mester, Z.; *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 202A.
65. Burguera, J.L.; Burguera, M.; Rivas, C.; Carrero, P.; *Talanta* **1998**, *45*, 531.
66. Anderson, R.K.; Thompson, M.; Culbard, E.; *Analyst* **1986**, *111*, 1143.
67. D'Ulivo, A.; *Spectrochim. Acta Part B* **2004**, *59*, 793.
68. Howard, A.G.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **1997**, *12*, 267.

69. Del Razo, L.M.; Stýblo, M.; Cullen, W.R.; Thomas, D.J.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *174*, 282.
70. Devesa, V.; Del Razo, L.M.; Adair, B.; Drobná, Z.; Waters, S.B.; Hughes, M.F.; Stýblo, M.; Thomas, D.J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1460.
71. Braman, R.S.; Foreback, C.C.; *Science* **1973**, *182*, 1247.
72. Pitzalis, E.; Ajala, D.; Onor, M.; Zamboni, R.; D'Ulivo, A.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6324.
73. Musil, S.; Matoušek, T.; *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 685.
74. Dědina, J.; *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, *62*, 846.
75. Dědina, J.; Matoušek, T.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, *15*, 301.
76. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A.; *Spectrochim. Acta Part B* **2002**, *57*, 451.
77. Krumar, A.R.; Riyazuddin, P.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2007**, *87*, 469.
78. Pavageau, M.P.; Krupp, E.; de Diego, A.; Pecheyran, C.; Donard, O.F.X.; In *Comprehensive Analytical Chemistry Sample Preparation for Trace Analysis*; Mester, Z. and Sturgeon, R. (Edt.); Elsevier, 2003, p 495.
79. de Diego, A.; Pecheyran, C.; Tseng, C.M.; Donard, O.F.; In *Flow Analysis with Atomic Spectrometry Detection*; Sanz-Medel, A. (Edt.); Elsevier: Amsterdam, 1999, p 375.
80. Wake, B.D.; Bowie, A.R.; Butler, E.C.V.; Haddad, P.R.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 491.
81. Taurkova, T.; Svoboda, M.; Musil, S.; Matoušek, T.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 220.
82. Braman, R.S.; Johnson, D.L.; Foreback, C.C.; Ammons, J.M.; Bricker, J.L.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 621.
83. Arab-Zavar, M.H.; Howard, A.G.; *Analyst* **1980**, *105*, 744.
84. Andreae, M.O.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 820.
85. Edmonds, J.S.; Francesconi, K.A.; *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 2019.
86. Howard, A.G.; Comber, S.D.W.; *Mikrochim. Acta* **1992**, *109*, 27.
87. Howard, A.G.; Arbab-Zavar, M.H.; *Analyst* **1981**, *106*, 213.
88. Howard, A.G.; Salou, C.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **1998**, *13*, 683.
89. Howard, A.G.; Salou, C.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *333*, 89.
90. Hernández-Zavala, A.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Paul, D.S.; Walton, F.; Adair, B.M.; Dědina, J.; Thomas, D.J.; Stýblo, M.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2008**, *23*, 342.

91. Currier, J.M.; Svoboda, M.; Moraes, D.P.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.; *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 478.
92. Svoboda, M.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Dědina, J.; *Spectrochim. Acta Part B* **2015**, *111*, 46.
93. Pizzaro, I.; Gómez, M.; Palacios, M.A.; Cámara, C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 102.
94. Alava, P.; van de Wiele, T.; Tack, F.; Du Laig, G.; *Anal. Methods* **2012**, *4*, 1237.
95. Huang, J.H.; Fecher, P.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 800.
96. Li, N.; Fang, G.; Zhao, L.; Wang, S.; *Food Addit. Contam. Part A* **2009**, *26*, 839.
97. Matusiewicz, H.; Slachcinski, M.; *Microch. J.* **2006**, *82*, 78.
98. Brady, D.V.; Montalvo, J.G.; Jung, J.; Curran, R.A.; *At. Absorp. Newsl.* **1974**, *13*, 118.
99. Brady, D.V.; Montalvo, J.G.; Glowacki, G.; Pisciotta, A.; *Anal. Chim. Acta* **1974**, *70*, 448.
100. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.; *Metallomics* **2011**, *3*, 1347.
101. Junior, D.S.; Krug, F.J.; Em *Métodos de Preparo de Amostras*; Krug, F.J. (Edt.); 1<sup>a</sup> ed., Seção Técnica da Biblioteca CENA/USP: São Paulo, 2008, p 129.
102. Priego-Capote, F.; de Castro, M.D.L.; *TrAC Trends in Anal. Chem.* **2004**, *23*, 644.
103. Thomas, J.E. (org); *Fundamentos de engenharia do petróleo*; Interciência: Rio de Janeiro, 2004.
104. BP Statistical Review of World Energy. June 2015. Disponível em [www.bp.com/statisticalreview](http://www.bp.com/statisticalreview). Acessado em 16/02/2016.
105. Brasil – Empresa de Pesquisa Energética; *Balanço Energético Nacional 2015 – Ano base 2014: Relatório Síntese*; EPE: Rio de Janeiro, 2015. Disponível em [www.ben.epe.gov.br/downloads](http://www.ben.epe.gov.br/downloads). Acessado em 16/02/2016
106. Szklo, A.S.; Uller, V.C.; Bonfa, M.H.; *Fundamentos de Refino do Petróleo – Tecnologia e economia*; Interciência: Rio de Janeiro, 2012.
107. Speight, J.G.; *The Chemistry and Technology of Petroleum*; CRC Press: Boca Raton - Flórida, 2006.
108. [www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/automotivos/oleodiesel/](http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/automotivos/oleodiesel/). Acessado em 16/02/2016.
109. Ali, M.F.; Al-Maki, A.; Ahmed, S.; *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 536.
110. Ali, M.F.; Al-Maki, A.; El-Ali, B.; Martinie, G.; Siddiqui, M.N.; *Fuel* **2006**, *85*, 1354.

111. EN 590:2009. Automotive fuels. Diesel. Requirements and test methods
112. Conselho Nacional do Petróleo. Resolução CNP n° 5, de 29/11/1955.
113. Agência Nacional do Petróleo. Portaria ANP n° 310, de 27/12/2001.
114. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP n° 65, de 09/12/2011.
115. Padma, D.K.; *Talanta* **1986**, *33*, 550.
116. Norton, G.A.; Peters, R.E. *Fuel* **1993**, *72*, 1573.
117. Serafim, D. M.; Stradiotto, N. R.; *Fuel* **2008**, *87*, 1007.
118. Darjaa, T.; Yamada, K.; Sato, N.; Fujino, T.; Waseda, Y.; *Fresen. J. of Anal. Chem.* **1998**, *361*, 442.
119. Zhong, Z.; Li, B.; Zhu, Z.; Luo, L.; Huang, L.; Wu, X. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1044.
120. Kendall, D. S.; Schoenwald, S. D.; Siao, M.; Hendricks, S.; *Hazard. Waste Hazard.* **1995**, *12*, 373.
121. Campillo, N.; Penalver, R.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6735.
122. Machado, M.E.; Caramão, E.B.; Zini, C.A. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3200.
123. Catalan, L.J.J.; Liang, V.; Jia, C.Q.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1136*, 89.
124. Necemera, M.; Kumpa, P.; Rajcevic, R.; Jacimovic, R.; Ponikvar, M.; *Spectrochim. Acta B* **2003**, *58*, 1367.
125. Safavi, A.; Haghighi, B.; *Talanta* **1997**, *44*, 1009.
126. Atanassov, G.T.; Lima, R.C.; Mesquita, R.B.R.; Rangel, A.O.S.S.; Tóth, I.V.; *Analisis* **2000**, *28*, 77.
127. Younga, C.G.; Amais, R.S.; Schiavo, D.; Garcia, E.E.; Nóbrega, J.A.; Jones, B.T.; *Talanta* **2011**, *84*, 995.
128. Santeli, R.E.; Oliveira, E.P.; Carvalho, F.; Bezerra, M.A.; Freire, A.S.; *Spectrochim. Acta B* **2008**, *63*, 800.
129. Cruz, S.M.; Tirk, P.; Nora, F.M.D.; Schmidt, L.; Wiltche, H.; Bizzi, C.A.; Knapp, G.; Flores, E.M.M.; *Fuel* **2015**, *160*, 108.
130. Amais, R.S.; Long, S.E.; Nóbrega, J.A.; Christopher, S.J.; *Anal. Chim. Acta* **2014**, *806*, 91.
131. Craddock, P.R.; Rouxel, O.J.; Ball, L.A., Bach, W.; *Chem. Geol.* **2008**, *253*, 102.
132. Santamaria-Fernandez, R.; Hearn, R.; Wolff, J.C.; *Sci. Justice* **2009**, *49*, 102.

133. Hocking, T. J.; Gulick, W. M. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *151*, 195.
134. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *NBR 14533: Determinação de enxofre por espectrometria de fluorescência de raios-X (Energia dispersiva)*, 2000.
135. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*; Third edition, Wiley-VCH: Weinheim - Alemanha, 1999.
136. Kirkbright, G.F.; Marshall, M.; West, T.S.; *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 1288.
137. Roe, D.A.; Miller, P.S.; Lutwak, L.; *Anal. Biochem.* **1966**, *15*, 313.
138. Varley, J.A.; Chin, P.Y.; *Analyst* **1979**, *95*, 592.
139. Campbell, A.D.; Tioh, N.H.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *10*, 451.
140. Welz, B.; Vale, M.G.R.; Pereira, E.R.; Castilho, I.N.B.; Dessuy, M.B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 799.
141. Dittrich, K.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *97*, 59.
142. Dittrich, K.; *Prog. Anal. Atom. Spec.* **1980**, *3*, 209.
143. Welz, B.; Lepri, F.G.; Araujo, R.G.O.; Ferreira, S.L.C.; Huang, M.-D.; Okruss, M., Becker-Ross, H.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 137.
144. Tittarelli, P.; Lancia, R.; Zerlia, T. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2005.
145. Tittarelli, P.; Lavorato, G. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *201*, 59.
146. Parvinen, P.; Lajunen, L.H.J. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *295*, 205.
147. Becker-Ross, H.; Florek, H.; Heitmann, U.; Weisse, R.; *Fresen. J. Anal. Chem.* **1996**, *55*, 300.
148. Heitmann, U.; Schütz, M.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; *Spectrochim. Acta Part B* **1996**, *51*, 1095.
149. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; *High Resolution Continuum Source: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
150. Huang, M. D.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Okruss, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1877.
151. Huang, M. D.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Okruss, M.; *Spectrochim. Acta Part B* **2006**, *61*, 181.
152. Huang, M. D.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Okruss, M.; Patz, C. D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 361.
153. Baysal, A.; Akman, S.; *Talanta* **2011**, *85*, 2662.
154. Virgílio, A.; Raposo, J. L.; Cardoso, A. A.; Nóbrega, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 134.

155. Heitmann, U.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Huang, M. D.; Okruss, M.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2006**, *21*, 1314.
156. Ferreira, H. S.; Lepri, F. G.; Welz, B.; Carasek, E.; Huang, M. D.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2010**, *25*, 1039.
157. Resano, M; Flórez, M. R.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2012**, *27*, 401.
158. Baumbach, G.; Einax, J. W.; *Microchem. J.* **2014**, *117*,89.
159. Cadorim, H.R.; Pereira, E.R.; Carasek, E.; Welz, B.; Andrade, J.B.; *Talanta* **2016**, *146*, 203.
160. Rebouças, M.V.; Domingos, D.; Santos, A.S.O.; Sampaio, L.; *Fuel Process. Technol.* **2010**, *91*, 1702.
161. Brandão, G.P.; Campos, R.C.; Castro, W.V.R.; Jesus, H.C.; *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 880.
162. Heitmann, U.; Welz, B.; Borges, D.L.G.; Lepri, F.G.; *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, *62*, 1222.
163. Long, G.L.; Winefordner, J.D.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 712.
164. Silva, M.M.; Damin, I.C.F.; Vale, M.G.R. Welz, B.; *Talanta* **2007**, *71*, 1877.
165. Ozbek, N.; Akman, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4816.
166. Hoyos, L.J.; Primet, M.; Praliaud, H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 3367.
167. Albers, P.; Pietsch, J.; Parker, S.F.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, *173*, 275.
168. Qiao, H.; Jackson, K.W.; *Spectrochim. Acta Part B* **1991**, *46*, 184.