



Thales Matheus Caetano Santos da Silva

Estudo comparativo das concentrações de arsênio, e suas frações orgânicas e inorgânicas, em amostras de pescado das regiões das Costas Verde e do Sul do Estado do Rio de Janeiro.

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Química, do Departamento de Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. José Marcus de Oliveira Godoy

Rio de Janeiro
Março de 2024



Thales Matheus Caetano Santos da Silva

Estudo comparativo das concentrações de arsênio, e suas frações orgânicas e inorgânicas, em amostras de pescado das regiões das Costas Verde e do Sul do Estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo:

Prof. José Marcus de Oliveira Godoy

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Dr^a Tatiana Dillenburg Saint’Pierre

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Dr^a Rachel Ann Hauser Davis

Fiocruz

Rio de Janeiro, 07 de Março de 2024

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial do trabalho, é proibida sem a autorização da universidade, do autor e do orientador.

Thales Matheus Caetano Santos da Silva

Durante a graduação, participou de projetos como Programa de Incentivo de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID) e também estagiou na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV). Foi bolsista de mestrado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RIO) e desenvolveu pesquisa de especiação de arsênio em frutos do mar, na área de química analítica.

Ficha Catalográfica

Caetano, Thales Matheus Santos da Silva

Estudo comparativo das concentrações de arsênio, e suas frações orgânicas e inorgânicas, em amostras de pescado das regiões das Costas Verde e do Sul do Estado do Rio de Janeiro. / Thales Matheus Caetano Santos da Silva; orientador: José Marcus de Oliveira Godoy. – 2024.

70 f: il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2024.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Arsênio. 3. Toxicologia. 4. Frutos-do-mar. I. Godoy, José Marcus de Oliveira. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 004

Pelos meus irmãos, mãe e amigos

Agradecimentos

Agradeço a minha família

Agradeço aos meus amigos

Agradeço às pessoas que gostam de mim e passaram por mim na trajetória, que jamais serão esquecidas.

Agradeço ao meu professor e orientador Dr. José Marcus de Oliveira Godoy, professor da PUC-RIO há mais de 30 anos.

Agradeço à professora Dr^a Tatiana Dillenburg Saint’Pierre, que foi minha professora nas disciplinas métodos espectrométricos, tanto na teoria quanto experimental.

Agradeço ao professor Dr. Ricardo Queiroz Aucélio, professor de química analítica avançada e métodos espectrométricos.

Agradeço a minha amiga Ana Carolyne de Oliveira Cardoso, pelos momentos de apoio durante minha trajetória.

Agradeço ao técnico de laboratório e Dr Rodrigo Araújo Gonçalves.

Agradeço à aluna Cynthia Barreto.

Agradeço à PUC-RIO, aos funcionários em geral, incluindo os terceirizados e outros professores, que contribuem para o andamento da instituição.

Agradeço ao dono dos direitos autorais desse formato de trabalho, Augusto Ícaro, por ter me ajudado quando precisei.

Agradeço à PUC-RIO pela oportunidade de realizar a pesquisa em sua instituição, e agradeço ao CNPQ, instituição que me forneceu a bolsa e ter tornado isso possível.

Agradeço ao restante das agências de fomento, como CAPES e FAPERJ, que ajudam também outros alunos e os laboratórios com projetos científicos.

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

Resumo

Caetano, Thales Matheus Santos da Silva; Godoy, José Marcus de Oliveira. **Estudo comparativo das concentrações de arsênio, e suas frações orgânicas e inorgânicas, em amostras de pescado das regiões das Costas Verde e do Sul do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2024. 70p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

As Regiões das Costas Verde e do Sol são regiões litorâneas do Estado do Rio de Janeiro e se situam no sul e no norte do estado, respectivamente. Na Região da Costa do Sol existem evidências do papel da formação Barreiras como fonte do aporte de arsênio para os sedimentos costeiros e, conseqüentemente, para o pescado dessa região quando comparada com outras regiões. A hipótese de trabalho é a existência de maiores concentrações de As no pescado oriundo dessa região quando comparada com a outra região pesqueira do Estado do Rio de Janeiro, a Costa Verde. A concentração limite para arsênio em pescado, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é de 1 mg kg^{-1} , mas sabe-se que as espécies orgânicas de As como arsenobetaína compõem aproximadamente de 70% a 95% dos peixes e são atóxicas. Desta forma, para uma adequada interpretação do significado da presença de As no pescado, a diferenciação entre as inorgânicas, tóxicas, das espécies orgânicas tóxicas e não tóxicas, faz-se necessária. As amostras foram coletadas pela Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) e foram encaminhadas para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), onde foi retirada a parte referente ao filé, e então encaminhadas para a Pontifícia Universidade Católica (PUC-Rio) para a determinação e especiação de As. As técnicas utilizadas foram espectrometria de fluorescência atômica acoplado ao gerador de hidretos, ao fotorreator ultravioleta e ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-UV-GF-AFS) para determinar a quantidade de cada espécie de As e espectrometria absorção atômica acoplado a forno de grafite (GFAAS) para determinação de As total nas amostras. Foram feitos testes de extração de arsênio empregando amostras de referência certificadas, visando a sua especiação em amostras de pescado, e o método de extração escolhido foi ácido nítrico 2% (v/v) para determinação de arsênio total no GF-AAS, com índice de recuperação de até 100% reportado na literatura. Após realizar as curvas analíticas nos equipamentos, seguiu-se

para determinações de As total e especiação de As. Os resultados obtidos mostraram que poucas amostras apresentaram concentração de As acima do limite estimado pela ANVISA de 1 mg kg^{-1} . Considerando as amostras com concentração de As acima de $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$, constatou-se que de 70% a 95% de As encontra-se na forma de AsB, ressaltada a importância da especiação na avaliação da concentração de arsênio em amostras de pescado.

Palavras-chave

Arsênio; Toxicologia; Frutos-do-mar.

Abstract

Caetano, Thales Matheus Santos da Silva; Godoy, José Marcus de Oliveira (Advisor). **Comparative study of arsenic concentrations, and its organic and inorganic fractions, in fish samples from the Green Coast and Southern regions of the state of Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2024. 70p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The Costa Verde and Costa do Sol Regions are coastal regions of the State of Rio de Janeiro and are located in the south and north of the state, respectively. In the Costa do Sol region there is evidence of the role of the Barreiras formation as a source of arsenic input to coastal sediments and, consequently, to fish in this region when compared to other regions. The hypothesis is the existence of higher concentrations of arsenic in fish from this region when compared to fish from Costa Verde region. The limit concentration for As in fish, according to the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), is 1 mg kg^{-1} , but it is known that organic As species such as arsenobetaine make up approximately 70 to 95% of fish and are non-toxic. Therefore, for an adequate interpretation of the meaning of the presence of arsenic in fish, the differentiation between inorganic, toxic, toxic and non-toxic organic species is necessary. The samples were collected by the Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) and were sent to the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), where the part referring to the fish beef was removed, and then sent to Pontifícia Universidade Católica (PUC-RIO) for determination and speciation of As. The technique used was an atomic fluorescence spectrometer coupled to a hydride generator, an ultraviolet photoreactor and a high-performance liquid chromatograph (HPLC-UV-GF-AFS) to determine the amount of each species of arsenic and atomic absorption spectrometry coupled to a graphite furnace (GFAAS) to determine total arsenic in the samples. Arsenic extraction tests were carried out using certified reference samples, aiming at its speciation in fish samples, and the extraction method chosen was 2% nitric acid (v/v) for determination of total arsenic by GFAAS, with recovery rate of up to 100% reported in the literature. After carrying out the analytical curves on the equipment, determinations of total arsenic and arsenic speciation were carried out. The results obtained

showed that few samples presented arsenic concentration above the limit estimated by ANVISA of 1 mg kg^{-1} . Considering the samples with arsenic concentration above $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$, it was found that 70% to 95% is in the form of arsenobetaine, emphasizing the importance of speciation in the evaluation of arsenic concentration in fish samples.

Keywords

Arsenic; Toxicology; Seafood.

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Regiões da Costa do Sol e da Costa Verde e o projeto sobre quantificação de As	16
1.2	Características de As	18
1.3	Especiação Química	19
1.4	Toxicologia de arsênio	20
1.5	Revisão bibliográfica dos métodos para a determinação de arsênio total em peixes	22
1.6	Revisão bibliográfica de métodos de especiação de As em peixes	25
1.7	Métodos estatísticos de tratamento de dados	30
2	Objetivos	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	Procedimentos experimentais	33
3.1	Determinação de temperatura de atomização e pirólise para preparo de curva de calibração de arsênio pelo método GF-AAS com uso de modificador e extração de arsênio das amostras certificadas BCR-627 e DORM-2	33
3.2	Determinação de arsênio total nos peixes por GFAAS	34
3.3	Determinação de AsB empregando o método HPLC-UV-HG-AFS	35
4	Resultados e discussões	39
4.1	Condições experimentais do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite para a determinação de arsênio total	39
4.2	Curva analítica para As, resultados de extração dos materiais certificados de amostras de peixe e determinação de As total em amostras de pescado	40
4.3	Resultados das análises de amostras para As total nas regiões estudadas	44
4.4	Apresentação dos resultados obtidos por (HPLC-UV-HG-AFS)	48
4.5	Implicações na saúde dos seres vivos estimados pelo consumo de alimentos contendo As e uma estimativa de consumo com base no trabalho apresentado	53
5	Conclusão	56
6	Referências bibliográficas	58

Lista de figuras

Figura 1.1	Municípios que compõem a região da Costa do Sol (Araruama, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Armação dos Búzios, Saquarema, Rio Bonito, Rio das Ostras, São Pedro D'Aldeia, Macaé, Quissamã, Carapebus, Iguaba Grande, Casimiro de Abreu e Maricá). Gerado no Google Maps. Acesso livre	16
Figura 1.2	Municípios que compõem a região da Costa Verde (Mangaratiba, Angra dos Reios, Itaguaí, Paraty, Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha Bela). Gerado no google maps. Acesso livre	17
Figura 1.3	Representação em barras de publicação por áreas	24
Figura 1.4	Representação em barras de publicações por países	24
Figura 1.5	Representação em barras de publicações por ano	25
Figura 1.6	Representação em barras de publicação por áreas	26
Figura 1.7	Representação em barras de publicações por países	26
Figura 1.8	Representação em barras de publicações por ano	27
Figura 3.1	Imagem do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com efeito zeeman obtida no laboratório (arquivo pessoal)	33
Figura 3.2	Representação esquemática do preparo de amostras de análise de arsênio total em peixe (imagem meramente ilustrativa)	35
Figura 3.3	Representação do procedimento experimental do método HPLC-UV-HG-AFS	37
Figura 4.1	Curva de pirólise e atomização de As no forno de grafite obtida com modificador de Pd(NO ₃) ₂	39
Figura 4.2	Programa de temperatura definido para o forno de grafite	40
Figura 4.3	Curva analítica de As pelo espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite	41
Figura 4.4	Plotagem de resíduos em relação à concentração de As	42
Figura 4.5	Gráfico de barras representativo da concentração de As total nas amostras de <i>Priacanthus Arenatus</i> , com barra de cor preta, e <i>Pomatomus Saltatrix</i> , com barras cor vermelha nas amostras coletadas na Região da Costa do Sol. Os desvios padrões estão demonstrados como desvio padrão na cor verde. A barra amarela está fixada aproximadamente no valor de 0,8 mg kg ⁻¹ para As total encontrado nas amostras	44
Figura 4.6	Gráfico de barras representativo da concentração de As total nas amostras de peixe da espécie <i>Priacanthus Arenatus</i> , com barra de cor preta	45
Figura 4.7	Gráfico de barras representativo de comparação da concentração das amostras da espécie <i>Priacanthus Arenatus</i> das regiões estudadas. A barra amarela está fixada aproximadamente no valor de 0,8 mg kg ⁻¹ para As total encontrado nas amostras	46
Figura 4.8	Teste de box plot das análises de concentração de As nas amostras de peixe por comparação entre espécies <i>Priacanthus Arenatus</i> e <i>Pomatomus Saltatrix</i> (n=42)	47

Figura 4.9	A figura 4.9 apresenta o cromatograma obtido para diferentes concentrações de arsenobetaina na faixa de 5 a 50 ug L ⁻¹	49
Figura 4.10	Gráfico da curva analítica para AsB realizada	49
Figura 4.11	Gráfico de resíduos de AsB	50
Figura 4.12	Corrida cromatográfica para amostra certificada DORM-2. A linha verde é referente ao sinal com fluorescência. A linha azul é o sinal de fluorescência com a solução diluída em 10 vezes. A linha laranja representa o experimento sem a utilização do equipamento fotorreator ultravioleta	51
Figura 4.13	Corrida cromatográfica para amostra certificada BCR-627. A linha verde é referente ao sinal com fluorescência. A linha azul é o sinal de fluorescência com a solução diluída em 2 vezes. A linha laranja representa o experimento sem a utilização do equipamento fotorreator ultravioleta	51
Figura 4.14	Concentração de AsB nas amostras com As total aproximadamente e acima de 0,8 mg kg ⁻¹	52
Figura 4.15	Comparação das concentrações de AsB e As total nas amostras de peixe. As barras em roxo representam a concentração de AsB. As barras pretas se referem à concentração de As total da espécie Priacanthus Arenathus da Região da Costa do Sol. As barras vermelhas representam a concentração de As total da espécie Pomatomus Saltatrix da Região da Costa do Sol	53
Figura 4.16	Ilustração do efeito de bioacumulação nos peixes ao longo do tempo devido à exposição a As (arquivo pessoal)	54
Figura 4.17	Gráfico adaptado de massa média do homem e da mulher. Adaptado de Report of the task group on reference man	54

Lista de tabelas

Tabela 1.1	Artigos levantados nos últimos 10 anos sobre determinação de As total em peixes	22
Tabela 1.2	Dados extraídos dos artigos da tabela 1.1	23
Tabela 1.3	Artigos levantados nos últimos 10 anos sobre determinação de As total em peixes	28
Tabela 1.4	Dados extraídos dos artigos da tabela 1.3	28
Tabela 1.5	Métodos de extração para especiação em relação aos artigos da tabela 1.3	29
Tabela 3.1	Especificações e origem das amostras	34
Tabela 3.2	Especificações da coluna cromatográfica AS7	36
Tabela 3.3	Especificações do gerador de hidretos, espectrômetro de fluorescência atômica e UV	37
Tabela 4.1	Parâmetros da curva analítica	41
Tabela 4.2	Resultados das extrações com ácido nítrico a 2%(v/v)	43
Tabela 4.3	Parâmetros estatísticos	50
Tabela 4.4	Resultados da especiação de AsB nas amostras certificadas	52

Lista de Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

GF-AAS-Zeeman – Absorção atômica com forno de grafite e com efeito zeeman

HPLC-UV-HG-AFS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a reator com ultravioleta com espectrômetro de fluorescência atômica com gerador de hidretos

1

Introdução

1.1

Regiões da Costa do Sol e da Costa Verde e o projeto sobre quantificação de As

A região da Costa do Sol com os municípios que a formam está representada na figura 1.1 abaixo:

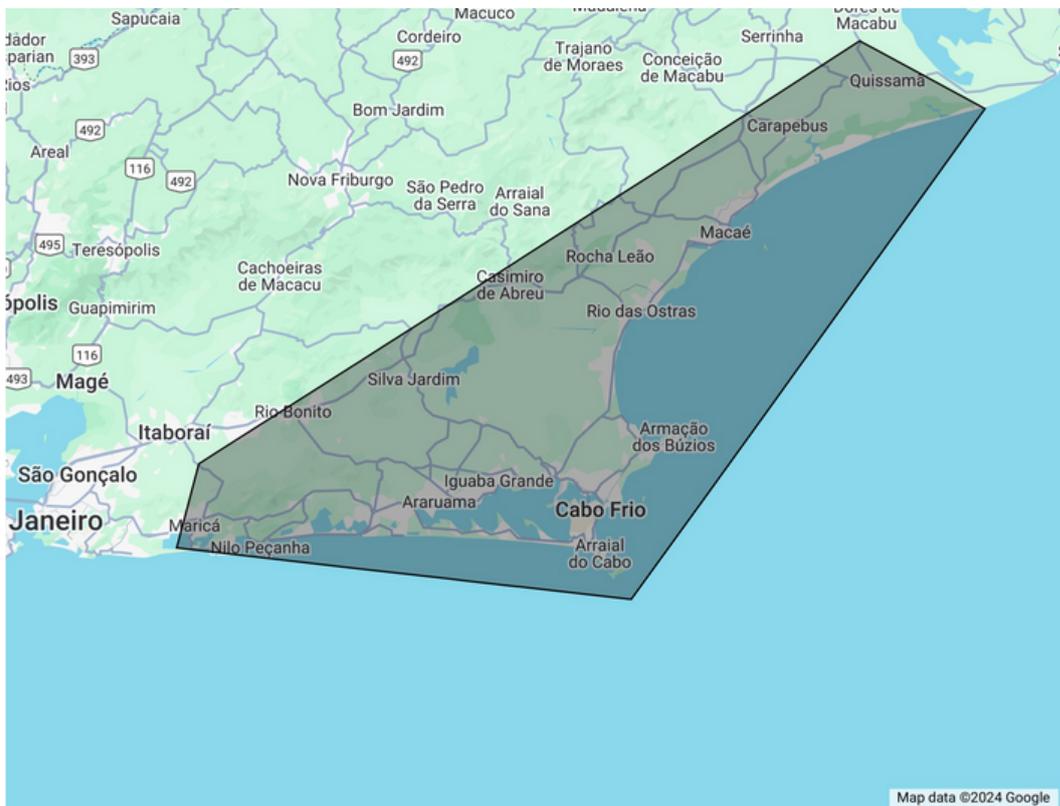


Figura 1.1: Municípios que compõem a região da Costa do Sol (Araruama, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Armação dos Búzios, Saquarema, Rio Bonito, Rio das Ostras, São Pedro D'Aldeia, Macaé, Quissamã, Carapebus, Iguaba Grande, Casimiro de Abreu e Maricá). Gerado no Google Maps. Acesso livre

A formação Barreiras é uma formação geológica rica em óxido de ferro e manganês, e é também considerada uma fonte de arsênio, sendo prevalente na região costeira brasileira do Amapá ao norte do Estado do Rio de Janeiro.^(1, 2)

A presença de As nos sedimentos costeiros da região do litoral do Estado do Espírito Santo tem duas origens: os sedimentos da formação Barreiras, rica em arsênio, devido ao material erodido e transportado pelo Rio Doce e carbonatos biogênicos, oriundos da erosão de corais de recife, nos quais o As se encontra incorporado.⁽³⁾

Cabe ressaltar que esse enriquecimento de As em corais das regiões afetadas pela formação Barreiras é um efeito indireto da presença de As nessa formação geológica. ^(1, 2)

Abaixo, a figura 1.2 representa a Região da Costa Verde, localizada entre o litoral norte do Estado de São Paulo e litoral sul do estado do Rio de Janeiro:

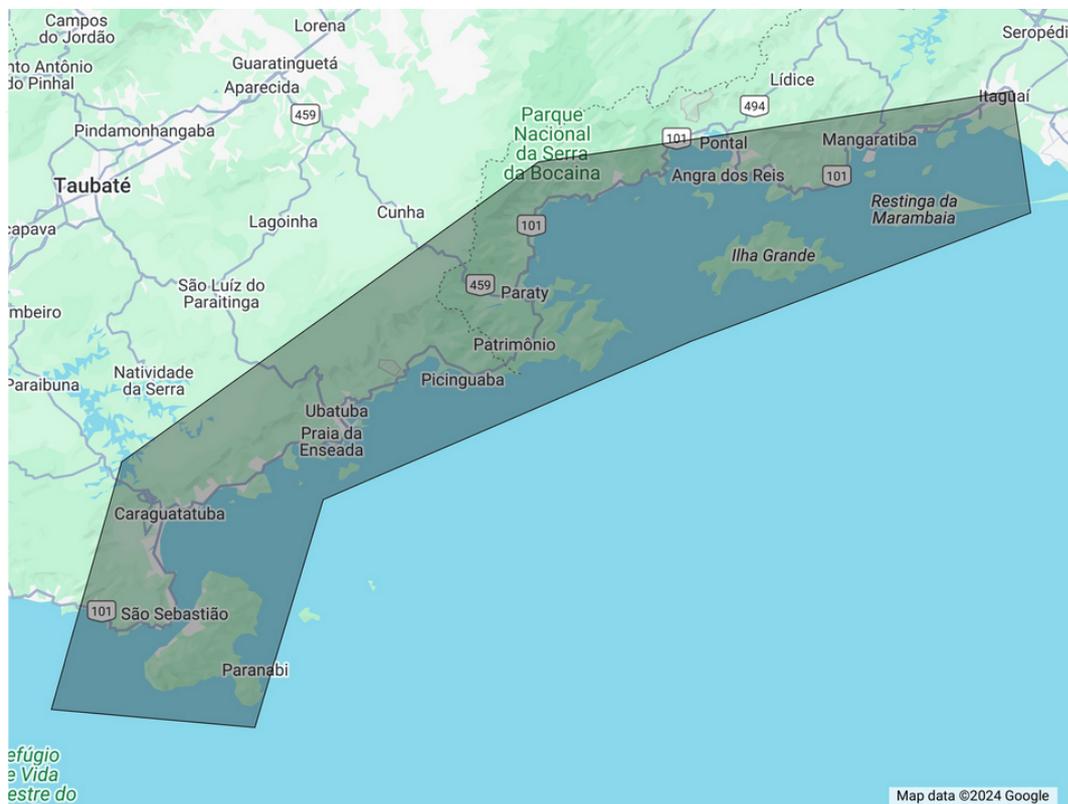


Figura 1.2: Municípios que compõem a região da Costa Verde (Mangaratiba, Angra dos Reis, Itaguaí, Paraty, Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha Bela). Gerado no google maps. Acesso livre

Em parceria com a UFF, FIPERJ, e a Fiocruz, a PUC-RIO participou de um projeto de pesquisa voltado para o estudo comparativo da concentração de As total em espécies comerciais de pescado das duas regiões, de nomes científicos *Priacanthus arenatus* e *Pomatomus Saltatrix* (L.), conhecidos como Olho-de-cão e Anchova, respectivamente, bem como da especiação do As naquelas cuja concentração de As total apresentasse acima do limite legal, estipulado pela ANVISA, de 1 mg kg^{-1} . A espécie *Priacanthus Arenatus* tem hábitos noturnos e se alimenta de larvas, crustáceos e peixes pequenos, além de ter o hábito de ficar 130 metros abaixo da superfície do mar. ⁽⁴⁾ Já os hábitos da espécie *Pomatomus Saltatrix* costumam ser distintos, permanecendo tanto em regiões de mar aberto como frequentando as regiões costeiras para fins de alimentação. ⁽⁵⁾

Segundo a literatura, cerca de 70-95% do As presente em pescado encontra-se na forma de AsB, a arsenobetaina, considerada atóxica. ⁽⁶⁾

1.2

Características de As

Arsênio é um metaloide que ocorre em várias formas na natureza e possui diferentes características, de acordo com seu estado de oxidação. Esse elemento ocorre naturalmente em estados de oxidação As^{+5} , As^{+3} e As^{-1} nos seres vivos, solo, sedimentos, água e atmosfera. As substâncias que contêm As desempenham diferentes impactos no meio em que se encontram. ⁽⁷⁻¹⁰⁾

Substâncias orgânicas e inorgânicas que contêm As em estados de oxidação III (As^{+3}) e V (As^{+5}) são consideradas mais tóxicas que aquelas que contêm outros estados de oxidação. ^(6, 11-24) As substâncias mais comuns de arsênio estudadas em amostras de pescado estão nas formas de ácido dimetilarsênico (DMA), ácido metilarsênico (MMA), arsenobetaina (AsB), arsenolipídeos e arsenoaçúcares. ⁽²³⁾

A toxicidade de moléculas e compostos associados ao As^{3+} é maior em relação ao As^{5+} , tanto em moléculas orgânicas, como DMA e MMA, quanto compostos inorgânicos, sendo as espécies inorgânicas mais tóxicas que as primeiras. (As_2O_3). ^(25, 26) Suas formas encontradas em solo, sedimentos, atmosfera e águas são variadas.

No ambiente marinho, as espécies que contêm As são encontradas em seres vivos como peixes e frutos do mar, além da possibilidade de serem encontrados também dissolvidos nas águas em suas formas oxoaniônicas. ^(27, 28) Em mares e rios, a composição de espécies de As^{3+} e As^{5+} também pode variar de acordo com a profundidade das águas. Em partes mais oxidantes e em águas superficiais, a concentração da espécie As^{5+} será predominante. Em águas subterrâneas, regiões mais redutoras, há predominância da espécie As^{3+} . Outra fonte de arsênio são os eventos vulcânicos, responsáveis por expelirem muitas substâncias químicas na atmosfera e em águas. Esse elemento também é posto no ecossistema através de atividades industriais, como empresas de metalurgia. ⁽²⁹⁾

É também fonte de As a atividade agrícola, através de sua utilização como preservador de madeiras. ⁽³⁰⁾ Observa-se, então, que a inserção de As no ecossistema se dá tanto de forma natural quanto antropogênica. ^(31, 32) Observa-se, finalmente, que As é um elemento diversificado em questão de composição química, estrutura molecular (orgânicos) e de compostos inorgânicos. Outros autores também mencionam esse ciclo de As como importante para a natureza. ^(29, 33, 34) Arsênio também pode ser encontrado nas rochas tanto

superficiais quanto subterrâneas, em razão de oxidação natural de sulfatos e carbonatos juntos aos minerais. Uma outra fonte de As é a decomposição de microorganismos que contenham esse elemento, por fungos e bactérias, que gera vapores de (AsH_3) .⁽³⁵⁾ Além dessas ocorrências, há também formas atóxicas que compõem a quantidade total de As em peixes e frutos do mar.⁽³⁶⁾ Tais formas são as arsenobetaínas, arsenolipídeos e arsenoaçúcares.^(37, 38) Arsenolipídeos, exatamente como o nome sugere, é uma denominação a um grupo de moléculas que contém As junto a moléculas de lipídeos. Estudados e reportados como atóxicos, arsenolipídeos ainda são objeto de estudos na investigação de toxicidade de As em frutos do mar. Alguns autores de artigos tentam entender a função de arsenolipídeos e se ocorrem naturalmente nesses animais. Ao tentarem entender se esses grupos causam intoxicação, conseguiram verificar que, na verdade, variavelmente há a interação desses arsenolipídeos com fosfolipídeos nos seres vivos marinhos, e que a depender da quantidade de fósforo nos fosfolipídeos, o arsenolipídeo entra no ambiente de forma natural.⁽³⁹⁾ De maneira análoga, os arsenoaçúcares são grupos de açúcares que contém As em suas composições e compõem majoritariamente águas vivas e frutos do mar, como lulas e polvos. Apesar de serem reportados majoritariamente como atóxicos, os arsenoaçúcares, recentemente, têm sido objeto de estudo para avaliar sua toxicidade nos organismos dos seres vivos.⁽⁴⁰⁾ A toxicidade de arsênio em organismos vivos está associada geralmente à interação desse elemento com moléculas que são importantíssimas para o ser vivo, podendo ocasionar danos ao DNA e inibição de enzimas.⁽⁴¹⁾ Há relatos de arsenoaçúcares poderem ser convertidos a outras moléculas, que não açúcares, via mecanismo biológico, e sendo assim, fontes de toxicidade no organismo. No entanto, não há pesquisas que comparem toxicidade entre arsenoaçúcares e outros grupos tóxicos de arsênio. E inclusive, não há, até hoje, relato de intoxicação por arsênio que seja atribuída à ingestão de arsenoaçúcares. E por fim, as arsenobetaínas são formas de arsênio que compõem a maior parte da quantidade total de arsênio em peixes. Esse grupo de arsenobetaínas é conhecido e relatado constantemente como arsênio não-tóxico, muito embora haja alguns poucos artigos que questionem a toxicidade desse grupo e dos mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão e na possível transformação dessas arsenobetaínas em outras espécies de arsênio, assim como arsenoaçúcares.^(22-24, 37, 38, 42)

1.3

Especiação Química

Especiação química é uma área de estudo que tem o objetivo de identificar e quantificar as diferentes espécies de um mesmo elemento numa determinada

amostra de uma matriz. A determinação total de elementos em amostras de diferentes matrizes já não satisfaz o mundo contemporâneo, e por isso, a especiação se tornou muito importante nos últimos anos em razão dos efeitos causados por diferentes espécies de mesmo elemento. Elementos comuns que são analisados para especiação são: germânio, arsênio, selênio e mercúrio. O ramo de especiação pode ser aplicado tanto para metais e metaloides em geral, que tenham estados de oxidação relativamente estáveis. Para se realizar especiação química de algum elemento em alguma amostra referente a alguma matriz, é necessário utilizar uma técnica de separação das espécies do elemento, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a algum espectrômetro, como espectrômetro de massas ou espectrômetro de absorção atômica.^(7, 28, 43) Diferentemente de alguns elementos, arsênio inorgânico é comprovadamente a forma mais tóxica. A necessidade de se realizar especiação desses elementos nas amostras de diferentes matrizes se dá em razão dos limites estabelecidos pela ANVISA, do Ministério da Saúde. No Brasil, por exemplo, o limite total de arsênio inorgânico total deve ser de 0,30 mg kg⁻¹ para espécies de peixes congeladas, crus ou refrigeradas, e de 1,00 mg kg⁻¹ para moluscos cefalópodos e moluscos bivalvos.⁽⁴⁴⁾

1.4

Toxicologia de arsênio

A ingestão de As pode ser por grandes doses, de forma aguda, ou por exposição crônica de pequenas doses. Altas doses de As por ingestão e inalação são muito tóxicas e levam rapidamente a doenças gastrointestinais, encefalopatia (relacionadas à deterioração de funções cerebrais) e neuropatias periféricas (doenças em nervos periféricos). As pessoas intoxicadas geralmente reclamam de gosto metálico na boca em razão da ingestão de contaminantes com alta dose de As. No entanto, os sintomas iniciais decorrente de doenças gastrointestinais são muito parecidos com outros como o cólera, resultando na dificuldade do diagnóstico. E também, os intoxicados apresentam vômitos nas horas iniciais após a infecção gastrointestinal, acompanhados de dor abdominal, dificuldade de engolir e secura na boca. As doenças relacionadas à deterioração de funções cerebrais estão relacionadas à cefaleia, delírio psíquico e desorientação.⁽⁴⁵⁾

Ainda sobre ingestão de altas doses de As, órgãos, dentro de pouco tempo, podem parar de funcionar. Falência renal, falência respiratória, extinção de funções cerebrais e falhas em funções cardiovasculares vitais são comuns.^(45, 46)

Decorrente da inalação, está o desenvolvimento de bronquite, rinite e laringite em casos mais brandos, mas há o desenvolvimento de hemorragia

bronquial e traquial em casos graves. Agora, em relação à exposição crônica de As em doses baixas, neuropatia periféricas e lesões na pele são típicas dessa patologia.⁽⁴⁶⁾

A exposição crônica a As inorgânico é estudada em locais com contaminação natural. Os sintomas não são específicos, mas lesões na pele e hiperpigmentação são patologias comuns provocadas pela exposição crônica a As inorgânico. Há também a característica do desenvolvimento da doença do pé preto, fenômeno de Reynaud, efeitos cardiovasculares, neuropatia periférica e neuróticos em crianças. Inalação crônica de As inorgânico provoca efeitos parecidos à exposição crônica de As tóxico geral: irritação do trato respiratório, efeitos provocados pelo desenvolvimento de doenças pulmonares e problemas com a mucosa nasal.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾

Ademais, o As inorgânico é considerado carcinogênico e estudos científicos mostram a relação positiva entre exposição crônica a As inorgânico e a ocorrência de cânceres.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾

1.5

Revisão bibliográfica dos métodos para a determinação de arsênio total em peixes

Procurou-se realizar levantamento sistemático do tipo Estado do Conhecimento, que visa reunir atualizações sobre conceito em uma determinada área em um determinado tempo. Inicialmente, foi escolhida a base de dados denominada 'Web of Science' para a procura da produção bibliográfica a respeito do assunto desse trabalho. As palavras-chave escolhidas foram 'arsenic', 'determination' and 'fish'. A faixa de tempo escolhida foi de 01-01-2014 até 20-09-2024. Como resultado, a pesquisa mostrou 125 resultados e 7 artigos de revisão. Os dados coletados abaixo estão representados em periódicos publicados, anos e países, e em gráficos de barra, e na tabela estão os artigos que foram encontrados com as informações sobre os limites de detecção e quantificação dos métodos utilizados.

Tabela 1.1: Artigos levantados nos últimos 10 anos sobre determinação de As total em peixes

Artigos
Simultaneous microwave digestion for total arsenic and inorganic arsenic in local shrimp and prawn commodities of Brunei Darussalam for regulatory and safety monitoring ⁽⁴⁸⁾
Simple and reliable determination of total arsenic and its species in seafood by ICP-MS and HPLC-ICP-MS ⁽⁴⁹⁾
Validation of an analytical method for the determination of inorganic, organic, and total arsenic in fish sauce based on hydride generation atomic absorption spectrometry ⁽⁵⁰⁾
Determination of Toxic Elements and Arsenic Species in Salted Foods and Sea Salt by ICP-MS and HPLC-ICP-MS ⁽⁵¹⁾
Determination of Metal Contamination in Seafood from the Black, Marmara, Aegean and Mediterranean Sea Metal Contamination in Seafood ⁽⁵²⁾
Arsenic speciation in seafood by LC-ICP-MS/MS: method development and influence of culinary treatment ⁽⁵³⁾
Spectrometric method for determination of inorganic contaminants (arsenic, cadmium, lead and mercury) in Smooth weakfish fish ⁽⁵⁴⁾
Sample Preparation Methods for Organic Arsenic Species (arsenobetain, $(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) in Tuna Fish Samples Followed by HG-QFAAS, GF-AAS, and ICP-MS Measurements ⁽⁵⁵⁾
Total Arsenic and Arsenic Species Determination in Freshwater Fish by ICP-DRC-MS and HPLC/ICP-DRC-MS Techniques ⁽⁵⁶⁾
Choline Chloride–Oxalic Acid as a Deep Eutectic Solvent–Based Innovative Digestion Method for the Determination of Selenium and Arsenic in Fish Samples ⁽⁵⁷⁾
Direct solid sample analysis with graphite furnace atomic absorption spectrometry—A fast and reliable screening procedure for the determination of inorganic arsenic in fish and seafood ⁽⁵⁸⁾
Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry ⁽⁵⁹⁾

Tabela 1.2: Dados extraídos dos artigos da tabela 1.1

Autores	Técnica	LQ (ug L ⁻¹)	LD (ug L ⁻¹)
Taib, M.H. e Lim, L. H.	ICP-MS e HVG-AAS	4	1,3
Nawrocka, Agnieszka et al.	ICP-MS e HPLC-ICP-MS	1	0,6
Long, Do Thi et al.	HG-AAS	NI	0,01
Hwang, In Min et al.	ICP-MS e HPLC-ICP-MS	0,221	0,069
Kuplulu, O. et al.	ICP-MS	0,023	0,5
Schmidt, Lucas et al.	ICP-MS	NI	NI
Silva, T. S. et al.	ICP-OES	0,00864	0,00202
Koesmawati, Agustini et al.	HG-QFAAS, GF-AAS, and ICP-MS	0,00046; 0,0112; 0,000195	0,00015; 0,00038; 0,000067
Kornorowicz, Izabela et al.	ICP-DRC-MS	0,17	0,056
Panhwar, Abdul H. et al.	ET-AAS	1,54	0,46
Zmozinski, Ariane V. et al.	SS-GF AAS e HR-CS SS-GF AAS	0,34; 0,16	0,10; 0,05
Pereira, Ederson et al.	HR-CS GF AAS	0,1	0,03

Abaixo, seguem os dados obtidos do levantamento realizado no site 'Web of Science'.

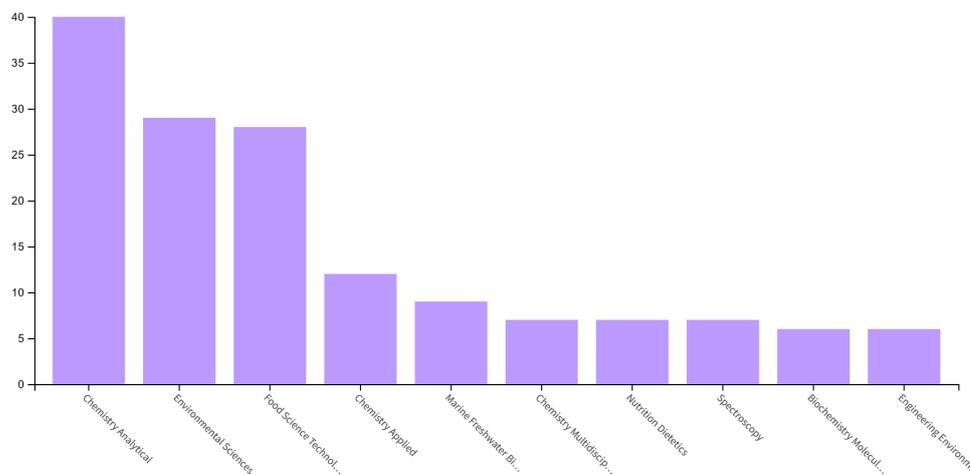


Figura 1.3: Representação em barras de publicação por áreas

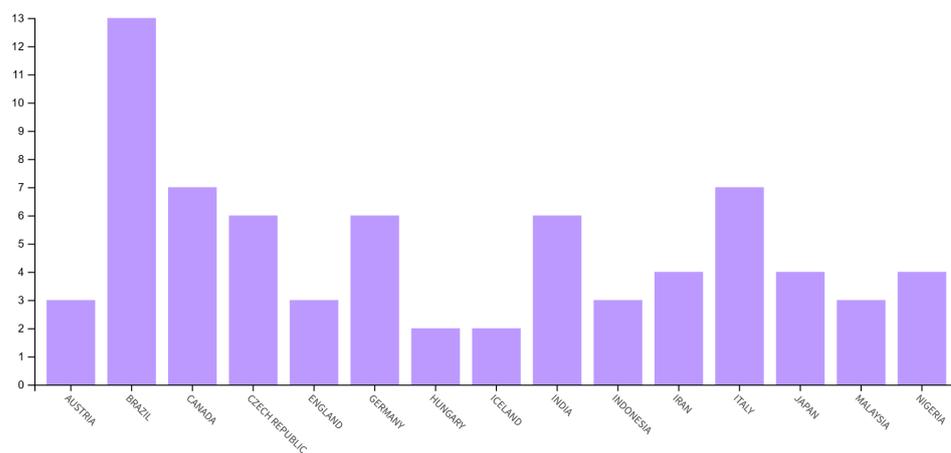


Figura 1.4: Representação em barras de publicações por países

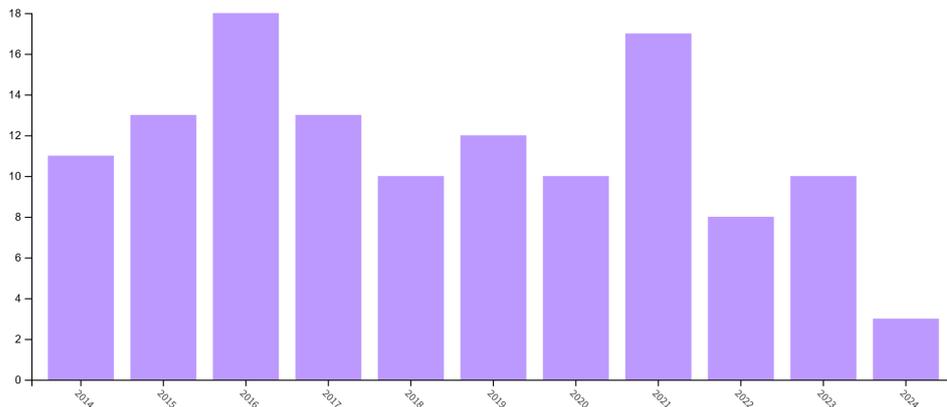


Figura 1.5: Representação em barras de publicações por ano

Pôde-se notar que a maioria dos artigos são publicados por pesquisadores brasileiros. Isso deve-se, possivelmente, a maior preocupação deles em relação a temas ambientais, decorrente de acidentes provocados por humanos em ecossistemas brasileiros.

A técnica utilizada nesse trabalho para determinação de As total não foi encontrada na maioria dos artigos pesquisados nas condições citadas, em razão de seu amplo desenvolvimento nos anos iniciais da espectrometria atômica. No entanto, em um artigo sobre especiação de metais em metaloides em peixe, denominado 'Sample Preparation Methods for Organic Arsenic Species (arsenobetain, $(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) in Tuna Fish Samples Followed by HG-QFAAS, GF-AAS, and ICP-MS Measurements' dos autores Koesmawati, Agustini et al. e que está listado na tabela, os limites de detecção e quantificação de arsênio total obtidos para o método de GF-AAS, em unidades de ug L^{-1} encontrados foram de '0,00038' e '0,0115', e outros métodos do mesmo trabalho, como ICP-MS e HG-QFAAS, apresentaram melhores limites de quantificação, de $0,000195 \text{ ug L}^{-1}$ e $0,00046 \text{ ug L}^{-1}$ respectivamente.

1.6

Revisão bibliográfica de métodos de especiação de As em peixes

Novamente, procurou-se realizar levantamento sistemático do tipo Estado do Conhecimento, que visa reunir atualizações sobre conceito em uma determinada área em um determinado tempo. As palavras-chave escolhidas foram 'arsenic', 'speciation' e 'fish'. A faixa de tempo escolhida foi de 01-01-2014 até 20-09-2024. Como resultado, a pesquisa mostrou 270 resultados e 22 artigos de revisão. Os dados coletados abaixo estão representados em periódicos publicados, anos e países, e em gráficos de barra, e na tabela estão os artigos

que foram encontrados com as informações sobre os limites de detecção quantificação dos métodos utilizados e também informações sobre os métodos de extração das espécies de As.

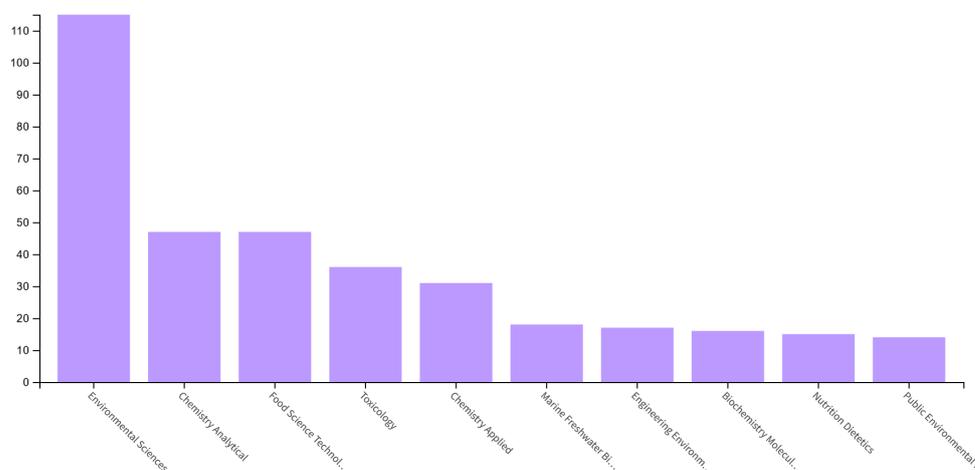


Figura 1.6: Representação em barras de publicação por áreas

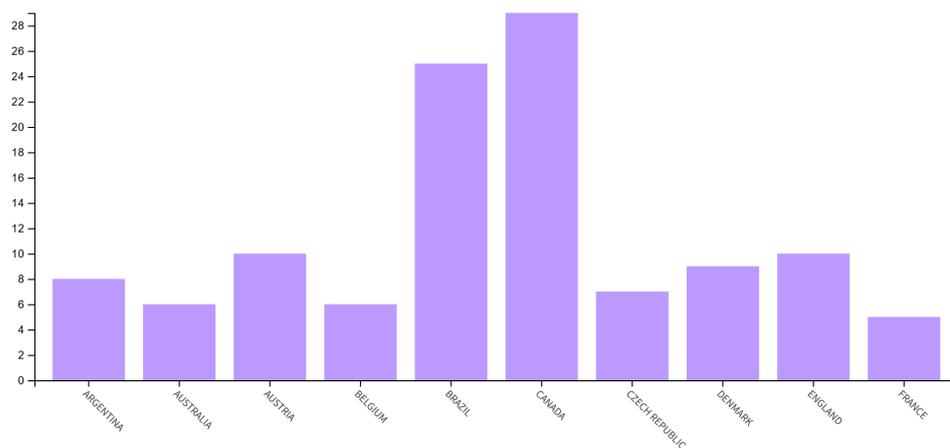


Figura 1.7: Representação em barras de publicações por países

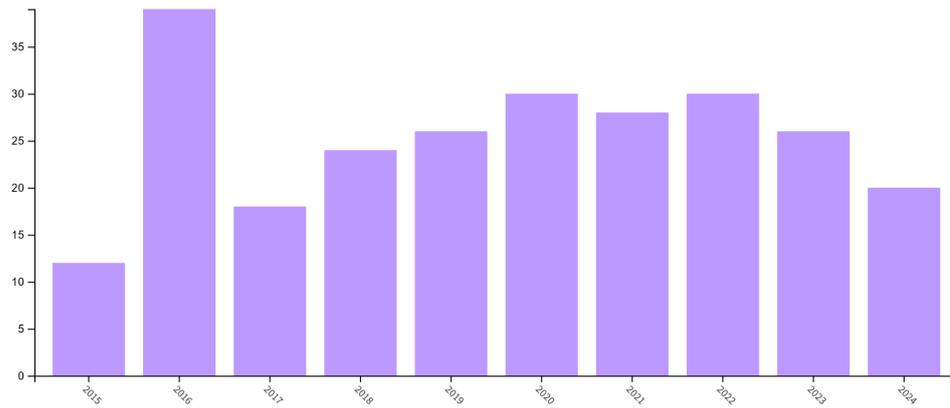


Figura 1.8: Representação em barras de publicações por ano

Agora, abaixo, encontram-se nas tabelas os únicos artigos com informações a respeito dos limites de detecção e quantificação do método utilizado:

Tabela 1.3: Artigos levantados nos últimos 10 anos sobre determinação de As total em peixes

Artigos
Arsenic speciation in fish from Greek coastal areas ⁽⁶⁰⁾
Arsenic speciation in fish from Baltic Sea close to chemical munitions dumpsites ⁽⁶¹⁾
Interspecific differences in the bioaccumulation of arsenic of three Patagonian top predator fish: Organ distribution and arsenic speciation ⁽⁶²⁾
Arsenic Speciation in Fish and Rice by HPLC-ICP-MS Using Salt Gradient Elution ⁽⁶³⁾
Speciation of Arsenic in Fish by High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry ⁽⁶⁴⁾
Arsenic speciation and arsenic feed-to-fish transfer in Atlantic salmon fed marine low trophic feeds based blue mussel and kelp ⁽⁶⁵⁾
Arsenic speciation in canned tuna fish samples (Thunnus) using ionic chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry ⁽⁶⁶⁾
Simultaneous speciation of arsenic and mercury in fish by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry ⁽⁶⁷⁾
Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Acu Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption ⁽⁶⁸⁾
Characteristics of arsenic speciation in mainly cultured shellfish from Sanmen Bay, Zhejiang Province, China ⁽⁶⁹⁾

Tabela 1.4: Dados extraídos dos artigos da tabela 1.3

Autores	Técnica	LQ (ug L ⁻¹)	LD (ug L ⁻¹)
Kalantzi, L.	HPLC-ICP-MS	N/I	0,4, 0,2, 0,3, 0,1 e 1 (AsB, iAs(iii), DMA, MMA e iAs(V))
Polak-Juszczak, Lucyna e Richert, Joanna Szlinder	HPLC-ICP-MS	0,22, 0,020, 0,040 e 0,020 (iAs (iii) + iAs(V))	N/I
Juncos, R. et al.	HPLC-ICP-MS	0,02	N/I
Nogueira, R. et al.	HPLC-ICP-MS	N/I	N/I
Ozcan, S et al.	HPLC-ICP-MS	0,58 (AsB) e 1,11 (DMA)	0,20 (AsB) e 0,33 (DMA)
Silva, MS et al.	HPLC-ICP-MS	0,01 (inorgânicas) e de 0,005 e 0,025 (restante não especificado)	NI
HOYNE, TFM et al.	LC-ICP-MS	0,59 mg kg ⁻¹ (AsB), 0,10 mg kg ⁻¹ (DMA), 0,12 mg kg ⁻¹ (As (III)), 0,07 mg kg ⁻¹ (MMA) and 0,10 mg kg ⁻¹ (As V)	N/I
Chen, Yung-Chun e Jiang, Shiuh-Jen	DRC-ICP-MS	N/I	0,005-0,007 (não especificado)
Gao, Y et al.	LC-ICP-MS, HG-AFS e LC-HG-AFS	N/I	0,0015 mg kg ⁻¹ DMA e 0,0030 mg kg ⁻¹ para As(V)
Ran. M. et al.	HPLC-ICP-MS	N/I	N/I

Tabela 1.5: Métodos de extração para especiação em relação aos artigos da tabela 1.3

Métodos de extração
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
HNO_3 (65%) + H_2O_2 (30%)
HNO_3 (1%) + H_2O_2 (1%)
metanol + água (1:1)
água
0,1 HNO_3 + 3% H_2O_2
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pH 10,5 em 0,05 % EDTA
metanol + água (1:1) e $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -methanol (99 + 1)

Os dados de artigos extraídos da base de dados da 'Web of science' sobre especiação de As em peixe confirma a maior preocupação de pesquisadores de países emergentes sobre avaliação e monitoramento de metais pesados nesses países. A maioria dos métodos de especiação envolvem o uso de HPLC-ICP-MS, em razão de sua praticidade e vantagens metodológicas em relação a outros métodos de especiação, como uso de gerador de hidretos acoplado com fluorescência atômica, pois o ICP-MS é multielementar e seu uso tem velocidade muito maior. Por motivos desconhecidos, alguns artigos não reportaram os limites de detecção e quantificação, e alguns que o fizeram, representaram na unidade de mg kg^{-1} , que significa que foi feito levando em consideração a massa de cada amostra e suas respectivas diluições. A maioria dos artigos de especiação identificaram a concentração percentual de AsB (não-tóxico) entre 65% e 95%. Em 2 artigos, houve o foco em detectar e quantificar DMA (dimetilarsínico), e desses dois, em apenas 1 houve o relato de quantificação de As (V), arsênio inorgânico e tóxico. E, também, outros artigos não especificaram o limite de detecção sobre as espécies estudadas, reportando-as como apenas "inorgânico" e "não-inorgânico". Os métodos de extração utilizados para especiação dos artigos analisados forma diversos, com a maioria tendo utilizado mistura de ácido nítrico com peróxido de hidrogênio, cuja recuperação pode ser de até 95% de As total. O uso de tampão de fosfato e carbonato é útil para estabilizar as espécies extraídas, sem convertê-las entre si. O uso de extratores de ácidos oxidantes pode interconverter as espécies de As e atrapalhar nas análises.

1.7

Métodos estatísticos de tratamento de dados

A precisão de um método é a avaliação expressa de concordância entre medidas experimentais, e pode ser calculada pelo desvio-padrão, intervalo de confiança da média e desvio-padrão relativo.⁽⁷⁰⁾

Dentro da precisão, é possível avaliar a repetibilidade do método, quando propõe-se avaliar condições estatísticas e intervalo de tempo pré-determinad. Também, é possível avaliar a precisão intermediária, quando há, por exemplo, experimentos realizados por diferentes analistas e reprodutibilidade, com resultados de precisão numérica em ensaios realizados em laboratórios diferentes.⁽⁷⁰⁾

A exatidão é expressa numericamente em termos de erro absoluto ou erro relativo, e é avaliada pelos valores da média estimada de um experimento e o valor teórico de referência.^(71, 72)

Os valores de referências são baseados geralmente em materiais de referência, métodos da literatura, ensaios recuperação e adição de analito.⁽⁷⁰⁾

A sensibilidade do método analítico é a reflexão entre a medida e a massa de analito, em unidade de concentração. É determinada através do coeficiente angular obtido da curva analítica. A sensibilidade analítica, que relaciona o coeficiente angular e o desvio padrão do sinal analítico complementa essa informação, pois leva em consideração o ruído dos sinais medidos.^(71, 72)

É dito que o conceito de limite de detecção do equipamento é o valor numérico que produz um sinal de 3 a 5 vezes maior que a relação sinal/ruído. E o limite de detecção do método é a concentração mínima do analito que pode ser distinguida de 0 com um nível de intervalo de confiança de 95 a 99%.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾

A faixa linear da curva analítica é representada pelo limite inferior dela, onde geralmente é o limite de quantificação, e o limite máximo é definido pela aferição visual de desvio de linearidade da curva analítica ou numericamente pelo desvio de pelo menos 5%.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾

A especificidade ou seletividade é a qualidade do método em validação analítica que diz respeito à avaliação e quantificação inequivocamente do analito na matriz que ele se encontra. Esse parâmetro de validação avalia interferências na medição do analito, com o objetivo de entender se os sinais obtidos são os mesmos com ou sem as interferências.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Testes de especificidade também envolvem verificação de resultados com procedimentos analíticos independentes, para verificação de possíveis interferentes.

Robustez é um parâmetro analítico que avalia a capacidade do método ser executado em diferentes condições, como diferentes temperaturas e concentração, com o objetivo de determinar qualitativamente a confiabilidade e estabilidade do método.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾

A linearidade do método é a curva que indica a relação de resposta do sinal medido com a concentração. A sua avaliação se baseia na aferição do coeficiente b , como coeficiente linear, o coeficiente a , o intercepto ou coeficiente angular e o R , coeficiente de correlação. O valor de R indica a adequação do método, e quanto mais esse valor estiver próximo de 1, melhor.⁽⁷⁰⁻⁷³⁾

A técnica de box plot é utilizada dentro do grupo de análise de dados exploratória para comparar grupo de dados através da mediana, dos primeiro e terceiro quartis, e máximos e mínimos dos dados fornecidos e apresentados. Essa técnica representa os dados de maneira organizada em relação aos dados crus e em relação às outras técnicas, como a técnica de histograma.⁽⁷⁴⁾

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar se existe uma diferença significativa na concentração de arsênio total em amostras de peixe oriundas das regiões da Costa Verde e da Costa do Sol.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os parâmetros experimentais de funcionamento do método de determinação de arsênio por GF-AAS, que são as temperaturas de pirólise e de atomização para o elemento arsênio, com utilização de reagente modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$.

Realizar recuperação de arsênio em amostras de músculos certificadas de BCR-627 e DORM-2, com utilização de métodos de extração já estabelecidos na literatura.

Determinar a concentração de arsênio total em amostras de *Priacanthus arenatus* e *Pomatomus saltatrix* das Regiões das Costas Verde e do Sol.

Realizar a especiação de As, em particular, da AsB naquelas amostras de peixe cuja concentração de As total estiver próximo de $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ou acima do valor de referência da ANVISA de 1 mg kg^{-1} .

Apontar possíveis consequências na saúde para a população brasileira em relação à exposição em alimentos que contém arsênio orgânico e inorgânico.

3

Procedimentos experimentais

3.1

Determinação de temperatura de atomização e pirólise para preparo de curva de calibração de arsênio pelo método GF-AAS com uso de modificador e extração de arsênio das amostras certificadas BCR-627 e DORM-2

Para fins de determinação da concentração de As total foi empregado um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite e efeito zeeman, da Varian modelo AA-240Z, como ilustrado na figura 3.1 abaixo:



Figura 3.1: Imagem do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com efeito zeeman obtida no laboratório (arquivo pessoal)

A descrição das amostras aparecem explicitadas na Tabela 3.1 abaixo, E as temperaturas de pirólise e atomização, bem como o programa de temperatura, foram otimizados nas etapas preliminares do presente trabalho. As curvas de calibração foram obtidas a partir de uma solução estoque Merck 1000 mg L^{-1} , da qual foi obtida uma solução estoque intermediária de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, as concentrações utilizadas correspondiam a 10, 20, 30, 40 e 50 ug L^{-1} . Além da sensibilidade analítica, foram determinados, ainda, os limites de detecção e de quantificação, bem como a precisão e a exatidão do método. No estudo desses dois parâmetros, foram empregados dois materiais de referência certificados: BCR-627 (Tuna Fish Tissue) do Institute for Reference Materials

and Materials (IRMM)/Comunidade Europeia e DORM-2 (Dogfish muscle) do National Research Council (NRC), Canadá. Ambos os MRC possuem valores certificados de As total e AsB.

Os materiais de referências certificados BCR-627 e DORM-2 se referem aos tecidos musculares das espécies de nome científico *Thunnus Thynnus*, um gênero que engloba diversos tipos de atum e a espécie de nome científico *Squalidae*, respectivamente.

3.2

Determinação de arsênio total nos peixes por GFAAS

As amostras de peixe espécies *Priacantus Arenathus* (Olho-de-cão) e *Pomatomus Saltatrix* (Anchova) foram coletadas, em parceria, pela FIPERJ - Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro -, UFF - Universidade Federal Fluminense - e Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz. Abaixo, a tabela 3.1 demonstra esses dados:

Tabela 3.1: Especificações e origem das amostras

Siglas, lugar de origem e espécies utilizadas			
Amostra	Local	Peixe	Espécie
OM01-20	Costa do Sol	Olho-de-cão	<i>Priacantus Arenathus</i>
OM21-40	Costa do Sol	Anchova	<i>Pomatomus Saltatrix</i>
PAREIG01-16	Costa Verde	Olho-de-cão	<i>Priacantus Arenathus</i>

Após separação da parte referente do filé de peixes, realizadas na Fiocruz, alíquotas de amostras foram encaminhadas para a PUC-RIO - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - para serem analisadas em seus laboratórios. As unidades das amostras foram divididas em duplicatas, e cada replicata analisada três vezes.

Pesou-se cerca de 0,5000 g de amostra e solubilizou-se em solução de ácido nítrico a 2% em tubo de centrífuga de 50 mL, feito de propileno, em banho maria na placa de aquecimento, mantendo-se a 90 °C por 90 minutos. Após isso, levou-se a centrífuga por 7 minutos em 1500 rpm para que todo o excesso remanescente se depositasse no fundo do tubo. A fase aquosa foi retirada com uma seringa plástica de 5 mL dotada de um filtro de membrana de 0,45 μm . Alíquotas de 1 mL foram colocadas nas cubetas do amostrador automático e adicionado 5 μL do modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ diluído a 1 mg L^{-1} . O procedimento adotado é ilustrado na figura 3.2 abaixo.

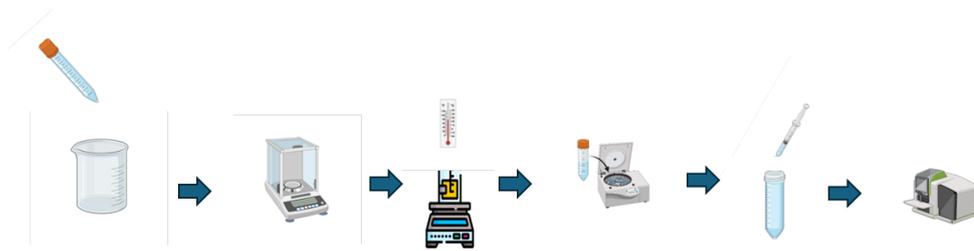


Figura 3.2: Representação esquemática do preparo de amostras de análise de arsênio total em peixe (imagem meramente ilustrativa)

As amostras preparadas nessa parte do procedimento experimental foram conservadas para a continuação para seu uso pelo espectrômetro de fluorescência atômica acoplado com gerador de hidretos e cromatografia líquida à alta pressão.

3.3

Determinação de AsB empregando o método HPLC-UV-HG-AFS

O sistema utilizado na determinação de AsB aparece na figura 3.3 e consiste de (1) um equipamento de cromatografia de alta pressão (HPLC), (2) da coluna cromatográfica AS7 da Thermo Scientific, (3) do espectrômetro de fluorescência atômica (PS Analytical Heating Module) e (4) de um foto reator (PS Analytical, PSA S570U100 UV/Heating Module). No foto-reator, através da ação combinada da luz UV e de um oxidante forte ($K_2S_2O_8$), há a oxidação do As orgânico em As^{5+} . A necessidade da utilização do foto-reator após a coluna advém da combinação de dois fatores: (i) empregando-se a coluna AS7, não se obtém uma separação entre os picos de As^{5+} e de AsB (ii) não há a geração de arsina partindo-se da arsenobetaina. Desta forma, são realizadas duas corridas cromatográficas, a primeira com o foto-reator desligado e a segunda com o mesmo em operação, sendo a concentração de AsB obtida pela diferença entre as duas corridas. As condições de operação do sistema HPLC foram uma vazão de 0,5 mL/min e a pressão de 0,5 bar, sendo HCl 3 mol L^{-1} empregado na eluição das espécies de As. As características da coluna AS7 são apresentadas na tabela 3.2. Para a determinação de AsB, primeiro

foi necessária a construção da curva analítica: utilizou-se padrões de AsB de concentração de 5, 10, 15, 20, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir da diluição de um padrão de AsB a 1,0 g kg^{-1} da fabricante Merck com utilização de seis replicatas.

Seis replicatas foram utilizadas para a construção da curva de calibração através da corrida cromatográfica. Então, visando a determinação da arsenobetaína empregando-se esse método, foi necessário, para cada ponto da curva analítica, a utilização do método com o reator de fótons UV e sem esse reator, com o objetivo de obter-se a curva de calibração de arsenobetaína pela diferença.

Utilizou-se uma microsseringa de vidro da Marca Hamilton avolumada a 50 μL para injetar na coluna cromatográfica.

As condições e especificações de operação da coluna cromatográfica AS7 de marca Thermo Scientific, que foi utilizada na tabela 3.2 abaixo, são:

Tabela 3.2: Especificações da coluna cromatográfica AS7

Especificações da coluna cromatográfica AS7	
Coluna cromatográfica	Thermo AS-7
Fase estacionária	IonicPac AS7
Vazão	0,12 a 0,75 mL/min
Hidrofobicidade	Média-alta
Grupo de troca iônica	Amônio quarternário de aquila
Pressão máxima	275 bar
Tamanho de partículas	Até 10 μm
Especificação química	Ácida
Diâmetro	2mm
Comprimento	250mm

A vazão utilizada para o experimento foi de 0,5 mL/min e a pressão de 0,5 bar.

As condições do AFS, HPLC e UV foram especificados abaixo na tabela 3.3:

Tabela 3.3: Especificações do gerador de hidretos, espectrômetro de fluorescência atômica e UV

Especificações	
Vazão de HCl em mol L ⁻¹	0,5
Concentração de HCl em mol L ⁻¹	3,0 mol L ⁻¹
Vazão de NaBH ₄ e NaOH em 0,7 mol L ⁻¹	0,5
Vazão de argônio	250 mL min ⁻¹
Tipo de lâmpada utilizada e comprimento de onda	Catodo oco e 193,7 nm
Corrente primária	27,5 mA
Boost corrente	35,0 mA
Lâmpada craqueadora do UV	10,570 hertz
Concentração de K ₂ S ₂ O ₈	0,1 mol L ⁻¹

Com as especificações da coluna cromatográfica apontadas, segue então abaixo o procedimento ilustrado na figura 3.3:



Figura 3.3: Representação do procedimento experimental do método HPLC-UV-HG-AFS

E então, para o preparo do reagente redutor tetraboridreto de sódio com hidróxido de sódio, pesou-se aproximadamente 4,000 g em um copo becher de vidro numa balança analítica. Após isso, houve a dissolução com auxílio de água ultrapura e, em seguida, houve a transferência quantitativamente a um balão volumétrico. No intuito de preparar a solução final de mistura de tetraboridreto de sódio e hidróxido de sódio, pesou-se 7,000 g de tetraidroboreto de sódio em um copo becher de vidro de 50 mL em uma balança analítica

e repertiu-se o procedimento utilizado para o hidróxido de sódio. Após tais procedimentos de dissolução, houve dissolução a 1 L a a mistura no balão volumétrico com uso de água ultrapura.

Para o preparo do reagente oxidante persulfato de potássio a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, pesou-se cuidadosamente 0,1 g de persulfato de potássio dentro de um becher em uma balança analítica e houve a transferência quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L, e então houve a dissolução com água ultrapura até atingir o menisco.

Os reagentes redutores são necessários para reduzir produzir os hidretos de arsênio pelo mecanismo conveniente supracitado, que vão por difusão, e solubilizados por argônio, até à chama para produzir fluorescência.

O reagente oxidante é utilizado para decompor as moléculas de AsB contidas nas amostras para conversão a moléculas de As mais simples.

4

Resultados e discussões

4.1

Condições experimentais do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite para a determinação de arsênio total

Foi feita a otimização das curvas de atomização e pirólise para As pelo espectrômetro de absorção atômica acoplado ao forno de grafite e obteve-se o seguinte gráfico na figura 4.1 abaixo:

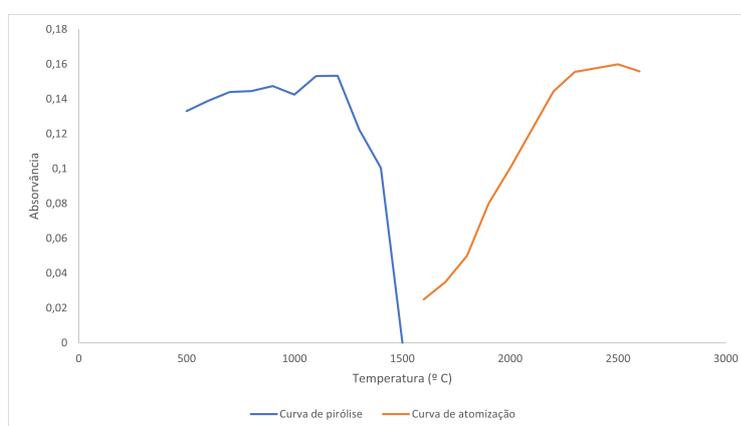


Figura 4.1: Curva de pirólise e atomização de As no forno de grafite obtida com modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$

Baseando-se na figura acima, chega-se a conclusão que a temperatura de pirólise ótima é 1200 °C e a temperatura ótima de atomização é 2300 °C. A temperatura de pirólise é aquela na qual há decomposição térmica dos compostos envolvidos na amostra analisada e é selecionada no momento anterior ao decaimento da curva, que indica o melhor sinal antes da amostra se decompor e após a decomposição da matriz.⁽⁷⁵⁾ A temperatura de atomização é aquela na qual há a atomização de As com o melhor sinal de absorvância. Teoricamente, esse seria o correto, mas na prática não é possível selecionar a maior temperatura com o maior sinal de absorvância em razão da possível degradação do forno de grafite. Então, a temperatura de atomização selecionada para o forno de grafite é aquela que antecede o platô de estabilidade de sinal após a ascendência da curva.⁽⁷⁶⁾

Então, as condições experimentais definidas para o forno de grafite são representadas na figura 4.2 abaixo:

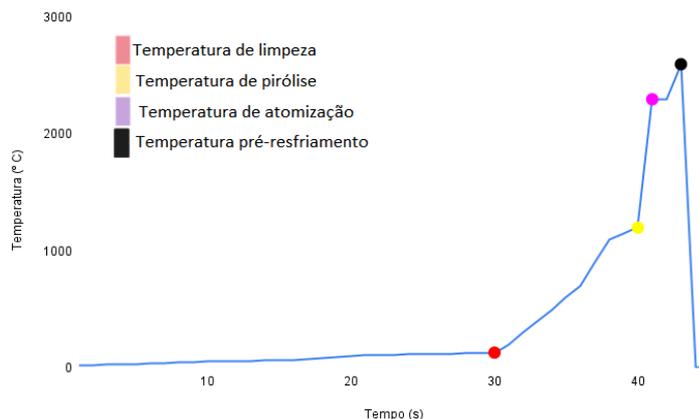


Figura 4.2: Programa de temperatura definido para o forno de grafite

A temperatura de limpeza é a temperatura na qual há a secagem do forno de grafite, que depende exclusivamente da temperatura de ebulição da mistura ou da substância que compor o solvente da matriz de análise.⁽⁷⁷⁾ Nesse caso, o solvente é o ácido nítrico a 2% (v/v), ou seja, a temperatura de ebulição do azeótropo formado com a água ultrapura é aproximadamente a mesma da água ultrapura, de 100 °C.

Todas as etapas acima estão de acordo com a maioria dos métodos analíticos que usam forno de grafite com espectrômetro de absorção atômica na determinação de As total.⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

4.2

Curva analítica para As, resultados de extração dos materiais certificados de amostras de peixe e determinação de As total em amostras de pescado

Os dados experimentais obtidos na determinação da curva analítica para a determinação de As por GFAAS são apresentados no anexo A. A curva analítica para a determinação de As por GFAAS aparece na figura 4.3. O valor de coeficiente de determinação (R^2) demonstra haver forte correlação linear entre concentração de As e o sinal obtido.

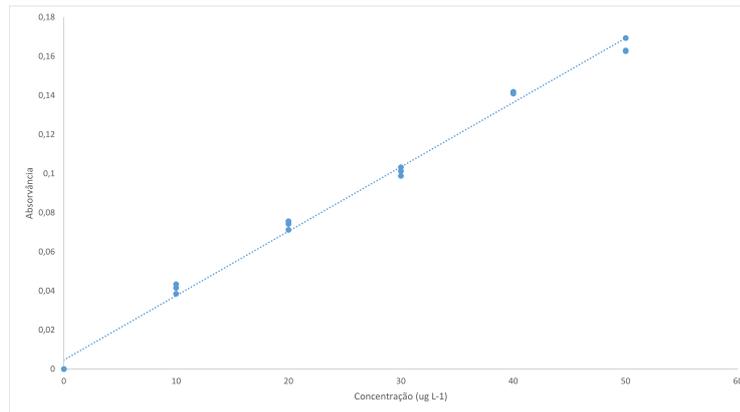


Figura 4.3: Curva analítica de As pelo espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite

Para sua construção, realizou-se o procedimento em triplicata. Essa curva analítica obtida foi utilizada tanto para os resultados de extração das amostras certificadas BCR-627 e DORM-2 e das amostras reais coletadas. Os limites de detecção e quantificação foram $1,1 \text{ ug L}^{-1}$ e $3,7 \text{ ug L}^{-1}$ respectivamente.

Abaixo, a tabela 4.1 diz respeito obtenção de dados da curva em referência à linearidade e outros parâmetros estatísticos necessários:

Tabela 4.1: Parâmetros da curva analítica

Parâmetros estatísticos da curva analítica e Valores	
Parâmetros	Valores
Faixa de concentração	$3,7 \text{ (ug L}^{-1}) - 50 \text{ (ug L}^{-1})$
Equação da curva analítica	$y = 0,0032x$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,997374
Equação da curva analítica completa (ajustada aos resíduos)	$y = (0,0032 \pm 0,000085)x + (0,0014 \pm 0,00257)$
Coefficiente de correlação ajustado aos resíduos (r)	0,9972

A forma como os dados acima foram obtidos se encontra no anexo A.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico necessário para avaliar a qualidade da curva construída, através de valores de referência para a correlação entre a concentração indicada e os valores experimentais obtidos. A ANVISA determina que o coeficiente de correlação ajustado aos resíduos (r) deve estar acima de 0,99, já o INMETRO, acima de 0,90.^(44, 73) O coeficiente em questão nesse experimento apresentou um valor de 0,9972, o que demonstra forte correlação entre as variáveis e os sinais experimentais de absorvância. A linha de tendência da curva analítica da figura 4.3 acima não passa, aparentemente, pelo 0. No entanto, através do tratamento de dados para achar a melhor linha de tendência que se adeque tanto aos dados quanto aos resíduos, verificou-se que o valor de 0 para b é possível, em razão da equação da curva analítica completa ajustadas aos resíduos encontrada na tabela 4.1.

A faixa linear de trabalho está compreendida entre o menor ponto possível de quantificação da curva analítica, que faça sentido para o método proposto. Esse menor ponto é o limite de quantificação. Já o ponto máximo da curva é arbitrário, e está de acordo com o procedimento experimental adotado. A diluição das amostras adequada foi planejada a obter-se faixa de concentração de As entre 1 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ levando em consideração a concentração de As nas amostras certificadas BCR-627 E DORM-2, bem como o volume da solução de extração e sua posterior diluição.

O tratamento dos resíduos resultante do experimento da curva analítica acima foi necessário para verificar o nível de viés do experimento, que pôde ser determinado em um gráfico que correlacionou os resíduos com as concentrações, como demonstrado na figura 4.4 abaixo:

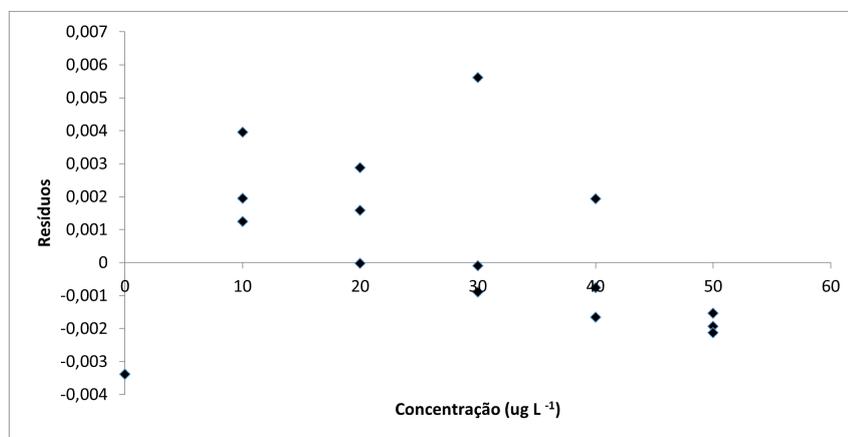


Figura 4.4: Plotagem de resíduos em relação à concentração de As

Através do gráfico disponível acima, é possível chegar a conclusão se o experimento foi realizado em conformidade com as boas práticas de laboratório, em que não se reproduz erro sistemático experimental. O gráfico de resíduos sugere não haver uma saturação do sinal para o ponto mais elevado da curva. No entanto, para a determinação do ponto de saturação a curva de calibração deveria ser expandida para maiores concentrações de As. O teste de homocedasticidade em relação a esses dados da curva analítica sugere que não há heterocedasticidade, pois a dispersão dos dados não aumenta conforme o aumento da concentração.

Após analisar os materiais certificados BCR-627 e DORM-2, cujos certificados aparecem no anexo C desse documento, pelo espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com corretor zeeman, obteve-se os seguintes resultados expressos na tabela 4.2, empregando-se a extração com ácido nítrico a 2%:

Tabela 4.2: Resultados das extrações com ácido nítrico a 2%(v/v)

Verificação de exatidão	
BCR-627 (mg kg ⁻¹)	DORM-2 (mg kg ⁻¹)
3.4 ± 0.5	17.1 ± 1.6
4.8 ± 0.3 (certificado)	18.0 ± 1.1 (certificado)
70% (recuperação)	95% (recuperação)

Esses resultados mostram que há concordância entre porcentagem de As total extraído utilizando ácido nítrico a 2% (v/v) e os resultados reportados na literatura.

Para obtenção de concentração total de As nessas amostras, basta que o método empregado seja eficaz. No entanto, para esse método, é preciso entender que a metodologia envolveu a atomização de As no ambiente do forno de grafite, que foi determinada na otimização do equipamento. O método de extração escolhido para esse experimento foi o de ácido nítrico a 2% (v/v), mas poderia ser pensada a possibilidade de utilizar um ácido mais forte, como o ácido nítrico concentrado P.A.

A teoria envolvida na detecção de As nessa metodologia pelo espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com ácido mais concentrado, que envolve o mecanismo de atomização do elemento, que depende da espécie de As que estiver no forno de grafite.⁽⁸¹⁾

Não é possível saber das espécies contidas baseando-se apenas nesse formulário contido no site dos dados do material de referência, pois não há a especificação total das espécies contidas na amostra certificada. Já há, no entanto, o reconhecimento das espécies de As serem degradadas em meio ácido.^(20, 21) Tal fenômeno encorre diretamente na determinação de As no GFAAS, em razão das espécies de As serem convertidas a espécies mais oxidadas em meio fortemente ácido, passando a requerer, assim, maior energia para atomizá-las.⁽²²⁾ Ou seja, há fortes possibilidade das espécies orgânicas simples e inorgânicas de As serem convertidas as espécies de As contendo As⁺⁵, e esses compostos possuem mais ligações químicas para serem quebradas e, conseqüentemente, necessitem de maior energia para serem atomizados.

Já foram feitos estudos sobre estabilidade de espécies de As em diferentes extratos e diferentes temperaturas de extração. Após os primeiros minutos de extração, entre análises feitas dentro de 1 hora, não houve mudança significativa de concentração de espécies de As obtida. No entanto, após serem guardadas na geladeira sob temperatura de 4 °C, foram reportadas as degra-

dações de espécies de As, como a AsB convertida a espécies desconhecidas, a espécies metiladas como DMA e MMA (sem padrões conhecidos) e espécies de As reduzidas sendo convertidas a espécies de As^{5+} .⁽²²⁻²⁴⁾

Tais conversões podem levar à atualização de métodos de extração e determinação de As e inclusive outros elementos nesses tipos de matrizes complexas, como a determinação sempre imediatamente após à extração feita em um digestor ou placa de aquecimento.

4.3

Resultados das análises de amostras para As total nas regiões estudadas

Com o objetivo de avaliar as diferenças de concentração de As total entre as espécies de peixe das Regiões da Costa Verde e do Sol, as amostras foram analisadas pelo método GFAAS especificado nos procedimentos experimentais supracitados. As amostras oriundas da região da Costa do Sol de *Pomatomus Saltatrix* e de *Priacanthus Arenatus* apresentaram o resultado representado nos gráficos na figura 4.5 em barras abaixo:

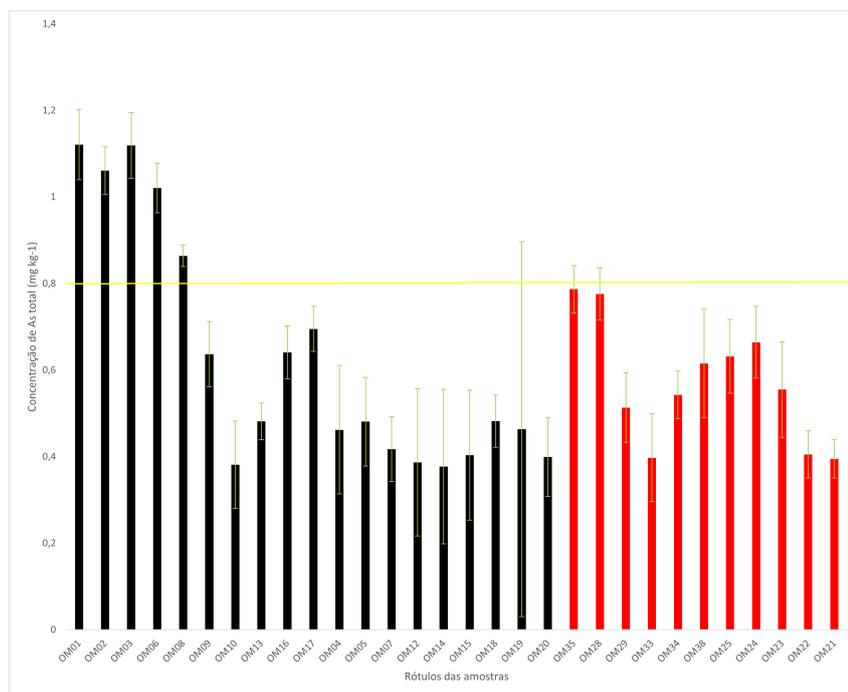


Figura 4.5: Gráfico de barras representativo da concentração de As total nas amostras de *Priacanthus Arenatus*, com barra de cor preta, e *Pomatomus Saltatrix*, com barras cor vermelha nas amostras coletadas na Região da Costa do Sol. Os desvios padrões estão demonstrados como desvio padrão na cor verde. A barra amarela está fixada aproximadamente no valor de 0,8 mg kg⁻¹ para As total encontrado nas amostras

Nota-se que a concentração de As é espécie-dependente, pois os peixes de

espécies diferentes possuem comportamentos diferentes. Os peixes da espécie *Pomatomus Saltatrix* possuem o hábito de ir a alto mar e, esporadicamente, ir à costa litorânea em busca de acasalamento e por isso, estão, a princípio, sob menor influência do fenômeno Barreiras. Então, essa espécie deve apresentar menor concentração de As do que a espécie *Priacanthus Arenatus* nessa região.

A formação Barreiras é um fenômeno neotectônico que influencia em toda região da costa brasileira entre o Amapá e o norte do Rio de Janeiro, englobando por conseguinte, a Região da Costa do Sol, como informado anteriormente.^(1, 2) Esse fenômeno, em resumo, influencia positivamente na concentração de As na biota e no bioma. Os peixes da espécie *Priacanthus Arenatus* costumam viver na costa litorânea e, esporadicamente, mergulhar para ir em busca de alimentos. Em razão da baixa luminosidade em altas profundidades marítimas, os peixes naturalmente acabam consumindo sedimentos junto aos alimentos. Então, em razão do fenômeno Barreiras, os sedimentos dessa região contém mais As do que o esperado naturalmente, e esse pode ser o motivo de os peixes da espécie *Priacanthus Arenatus* apresentarem maior concentração de As em suas amostras.

Agora, para Ilha Grande, município da Região da Costa Verde, foram analisadas apenas as amostras da espécie *Priacanthus Arenatus*, como mostra a figura 4.6 abaixo:

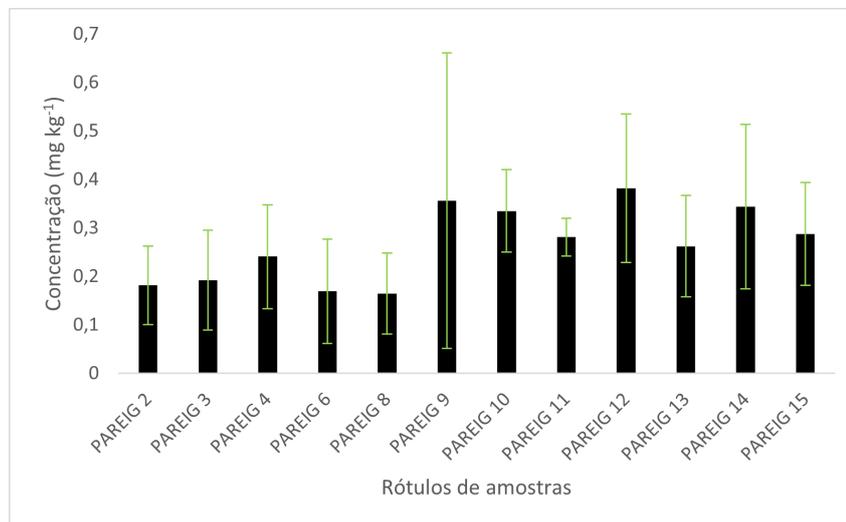


Figura 4.6: Gráfico de barras representativo da concentração de As total nas amostras de peixe da espécie *Priacanthus Arenatus*, com barra de cor preta

Com esse gráfico, é possível observar que para as amostras de peixe da espécie *Priacanthus Arenatus* desse local, que pertence à Região da Costa Verde, possuem menor concentração em relação às mesmas espécies da Região da Costa do Sol. O desvio padrão amostral analítico da amostra 9 apresentou foi grande, o que pode indicar um problema na análise dos peixes. Pensando em

mostrar a relação entre As total nas amostras de peixe da espécie *Priacanthus Arenatus* entre as regiões estudadas, obteve-se a figura 4.7:

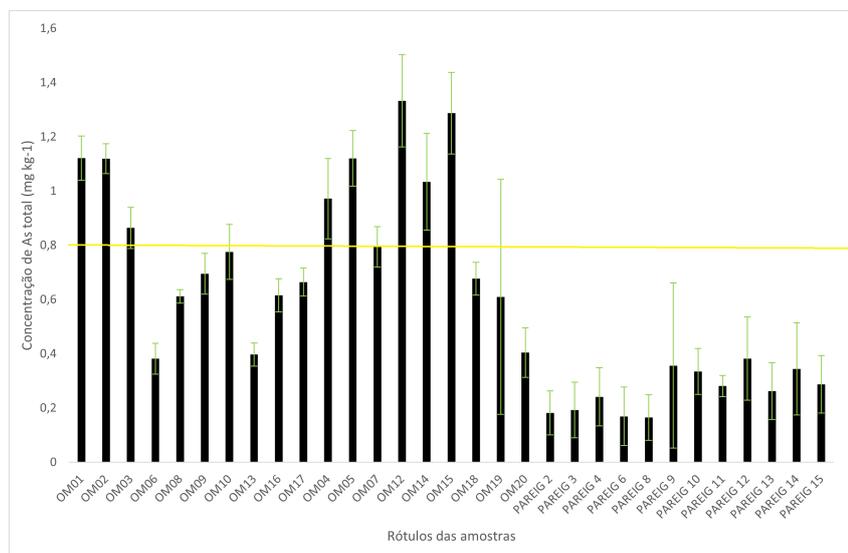


Figura 4.7: Gráfico de barras representativo de comparação da concentração das amostras da espécie *Priacanthus Arenatus* das regiões estudadas. A barra amarela está fixada aproximadamente no valor de $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ para As total encontrado nas amostras

O motivo para não coletar amostras de *Pomatomus Saltatrix* nessa região é desconhecido, mas suspeita-se de não ter conseguido coletá-los como na outra região.

Então, com os resultados apresentados nas imagens acima, foi possível realizar teste estatístico não paramétrico de box plot apresentado na figura 4.8 abaixo para verificar a média, mediana e possíveis outliers, de modo a permitir uma melhor comparação dos resultados obtidos envolvendo as duas regiões e espécies analisadas.

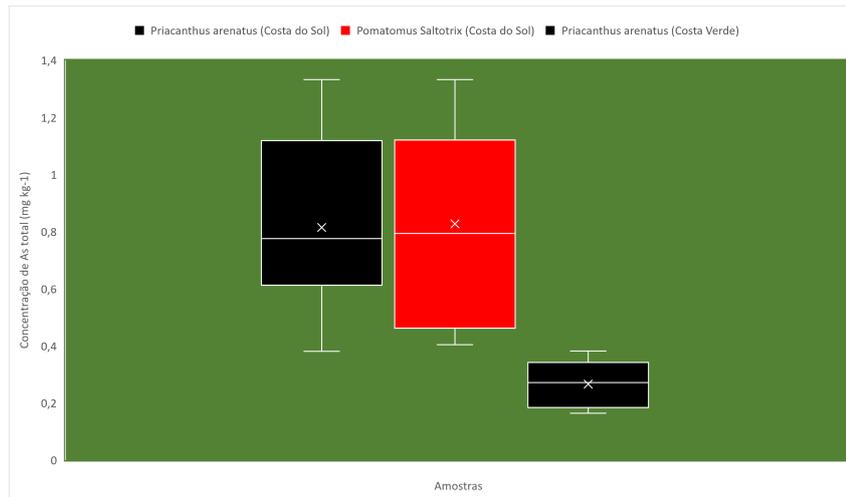


Figura 4.8: Teste de box plot das análises de concentração de As nas amostras de peixe por comparação entre espécies *Priacanthus Arenatus* e *Pomatomus Saltatrix* (n=42)

A Figura 4.8 valida a hipótese inicial desse trabalho de que a concentração de As em amostras de pescado da região da Costa do Sol seriam superiores às daquelas da Costa Verde, em função de uma maior concentração de As nos sedimentos em consequência da influência da Formação Barreiras.

As amostras de *Priacanthus Arenatus* da Região da Costa do Sol possuem simetria muito parecidas no teste de box plot. A média e a mediana são muito coincidentes. Para essa espécie, dessa região, há uma grande variação de concentração de As Total. Ou seja, há algumas amostras que possuem maior concentração desse elemento e isso pode ser preocupante. O box plot é uma técnica de inferência estatística poderosa exatamente por isso, pois a média como dado apresentado, unicamente, pode esconder esses dados importantes. Além disso, cabe lembrar que As é bioacumulativo nos seres vivos, e devido a essa informação, é necessário concluir que a média dos resultados não é suficiente para concluir as implicações da concentração de As Total nos peixes.

Os resultados para a amostra de *Pomatomus Saltatrix* apresentaram dispersão parecida dos dados em relação à *Priacanthus Arenatus*, como representados pela caixa vermelha no teste de box plot na figura 4.8 acima.

As amostras de peixe da espécie *Priacanthus Arenatus* da região da Costa Verde apresentaram concentração de As Total significativamente menores que às encontradas dessa mesma espécie na região da Costa do Sol. Isso, novamente, confirma a influência do fenômeno Barreiras na incidência de As Total na população de peixes da referida região.

Inclusive, é possível comparar a média de concentração de As total para essa mesma espécie em diferentes regiões estudadas e observar que a concentração média de As total para a Região da Costa do Sol é mais que o

dobro da concentração de As total para as amostras dessa espécie na Região da Costa Verde. E ainda, que é possível notar que a região superior do box plot desses dois grupos de amostra da Região da Costa do Sol apresenta muita diferença em relação ao grupo de amostra da Região da Costa Verde. O máximo de As total para as amostras dessa espécie *Priacanthus Arenathus* chega a ser mais que três vezes maior do que a quantidade máxima de As total determinada para as amostras de peixe dessa mesma espécie na Região da Costa Verde.

4.4

Apresentação dos resultados obtidos por (HPLC-UV-HG-AFS)

Para a construção da curva analítica e dos cromatogramas por esse método utilizou-se os dados obtidos expressos no anexo A.

Os dados obtidos para desvio padrão e desvio padrão relativo nos mostram que a técnica é precisa. Isso pode ser resultado do método que envolve separação do analito da matriz no gerador de hidretos, que ajuda minimizar as interferências. No entanto, há a suspeita de haver um outlier no sexto ponto para a concentração de 10 ug L^{-1} para esse experimento. Houve a necessidade de realizar o teste de Grubbs, um teste estatístico capaz de identificar outliers através da comparação entre a média do ponto e o ponto suspeito, através de sua relação com o desvio padrão. A equação do teste de grubbs é mostrada abaixo na equação 4.1,

$$TR = \frac{(\text{valor suspeito} - \text{médias dos valores})}{\text{desvio padrão}} \quad (4-1)$$

Então, com os dados acima, utilizou-se informações da tabela com dados do teste de grubbs no anexo E para decidir se o dado suspeito é um outlier, confirmando posteriormente a suspeita. E então, com o outlier excluído, realizou-se a corrida cromatográfica no método HPLC-UV-HG-AFS representada na figura 4.9 abaixo:

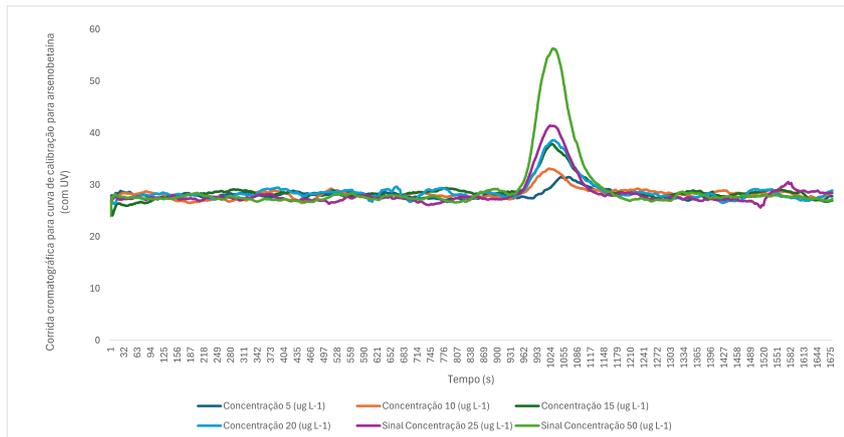


Figura 4.9: A figura 4.9 apresenta o cromatograma obtido para diferentes concentrações de arsenobetaina na faixa de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$

O cromatograma foi obtido para cada concentração dentro do método HPLC-UV-HG-AFS em sextuplicata. Para cada corrida, houve a programação de 28,15 minutos para o cromatograma ser feito. O cromatograma se refere às médias das corridas cromatográficas.

Abaixo, a figura 4.10 representa a curva analítica obtida com os dados fornecidos pelo método HPLC-UV-HG-AFS:

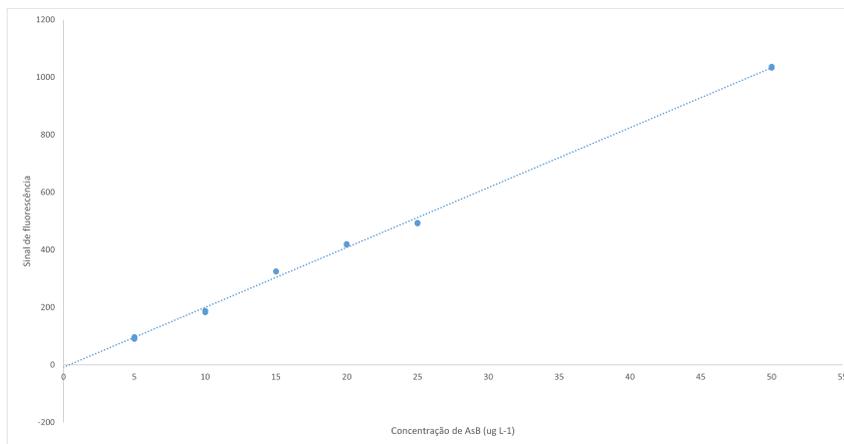


Figura 4.10: Gráfico da curva analítica para AsB realizada

Com os dados reportados acima obtidos pelo HPLC-UV-HG-AFS foi possível relacionar os valores de parâmetro de validação analítica expressos na tabela 4.3 abaixo:

Tabela 4.3: Parâmetros estatísticos

Parâmetros estatísticos da curva analítica realizada pelo HPLC-UV-HG-AFS	
Parâmetros	Valores
Faixa de concentração	0,97 ($\mu\text{g L}^{-1}$) - 50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Equação da curva analítica	$y = (20,56 \pm 0,46)x$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9977
Equação da curva analítica completa (ajustada aos resíduos)	$y = (20,56 \pm 0,46)x + (6,8395 \pm 11,7)$
Coefficiente de correlação ajustado aos resíduos (r)	0,9976

Apresentados os dados e realizada a curva analítica, foram determinados os limites de detecção e quantificação. No entanto, para esse método, não foi conveniente o tratamento de dados da curva analítica para o branco, pois só é possível obter o sinal correspondente ao analito. No entanto, não houve impedimento para determinação de tais limites. Se sabe que estes parâmetros analíticos são determinados através do desvio padrão de um branco, obtendo-se a média e multiplicando-a por 3 e, após isso, realizando a divisão pelo coeficiente angular da curva analítica. Escolheu-se, pela lógica, analisar o menor ponto da curva analítica, obter o desvio padrão dos dados e multiplicar por 3. Esse valor, em comparação ao valor nominal do menor ponto de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, é maior e por isso conclui-se que os limites de detecção e quantificação podem ser definidos pelo menor ponto da curva. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,97 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ainda, seguindo o tratamento de dados, foi realizado o tratamento para os resíduos obtidos e o gráfico da figura 4.11 foi obtido:

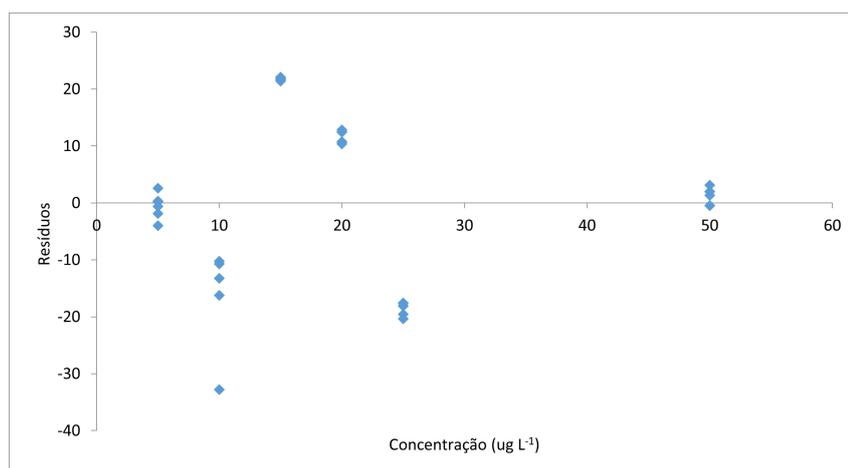


Figura 4.11: Gráfico de resíduos de AsB

Os resíduos foram plotados para cada ponto da curva analítica em sextuplicata, e representaram homogeneidade dos dados, levando a conclusão de não enviesamento do método utilizado. Os resíduos tratados foram subtraídos

da equação da curva analítica normal para obter o coeficiente de correlação corrigido.

Definidos então os parâmetros analíticos, foi necessário realizar experimento para verificar a exatidão do método analítico proposto, que passa pela análise de materiais certificados, os mesmos utilizados para a validação analítica do método GF-AAS com correção por efeito zeeman. Os cromatogramas que dizem respeito a esse teste de exatidão estão representados nas figuras 4.12 e 4.13 abaixo:

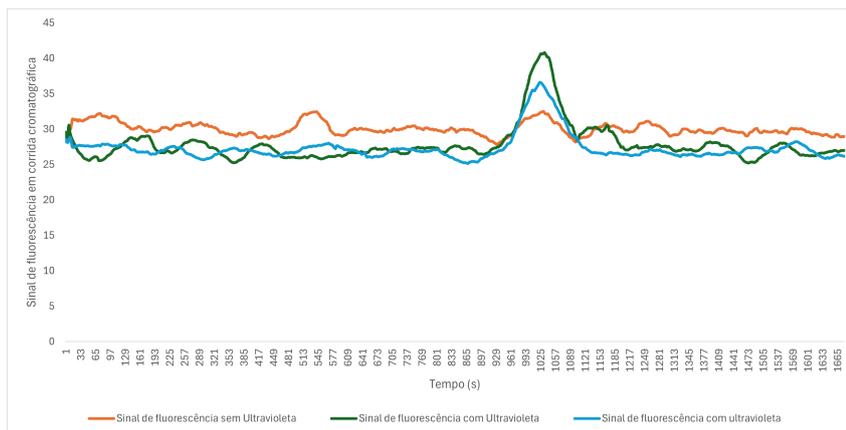


Figura 4.12: Corrida cromatográfica para amostra certificada DORM-2. A linha verde é referente ao sinal com fluorescência. A linha azul é o sinal de fluorescência com a solução diluída em 10 vezes. A linha laranja representa o experimento sem a utilização do equipamento fotorreator ultravioleta

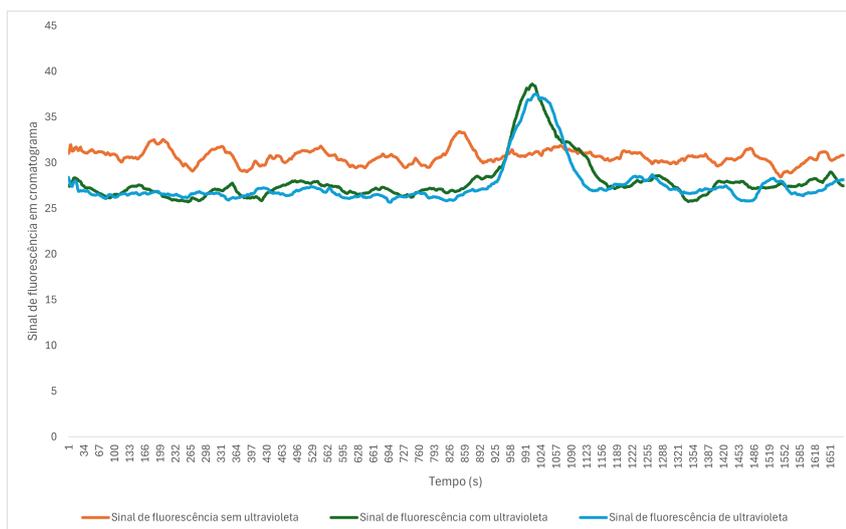


Figura 4.13: Corrida cromatográfica para amostra certificada BCR-627. A linha verde é referente ao sinal com fluorescência. A linha azul é o sinal de fluorescência com a solução diluída em 2 vezes. A linha laranja representa o experimento sem a utilização do equipamento fotorreator ultravioleta

Os cromatogramas representados acima são importantes para mostrar que o método foi significativo para aparição de AsB. As amostras diluídas foram feitas com o objetivo de tentar obter melhor sinal para AsB para caso houvesse alguma interferência. No experimento da corrida cromatográfica obtida para material certificado DORM-2, a curva com diluição apresentou menor sensibilidade. Já para a corrida cromatográfica do material certificado BCR-627, não houve diferença de sensibilidade. Abaixo, a tabela 4.4 representa a recuperação dos experimentos ao que as figuras 4.12 e 4.13 se referem:

Tabela 4.4: Resultados da especificação de AsB nas amostras certificadas

Verificação de exatidão	
BCR-627 (mg kg ⁻¹)	DORM-2 (mg kg ⁻¹)
3,3 ± 0,1	15 ± 0,8
3,9 ± 0,22 (certificado)	16,4 ± 1,1 (certificado)
84,6% (recuperação)	91,5% (recuperação)

Os resultados obtidos mostram que o método empregado permitiu uma recuperação de 85-90% da fração correspondente a AsB. Então, seguindo o procedimento para a análise de amostras de peixe, obteve-se os seguintes dados na figura 4.14 abaixo, considerando o critério de escolha de amostras que apresentaram concentração aproximadamente a 0,8 mg kg⁻¹ de As total:

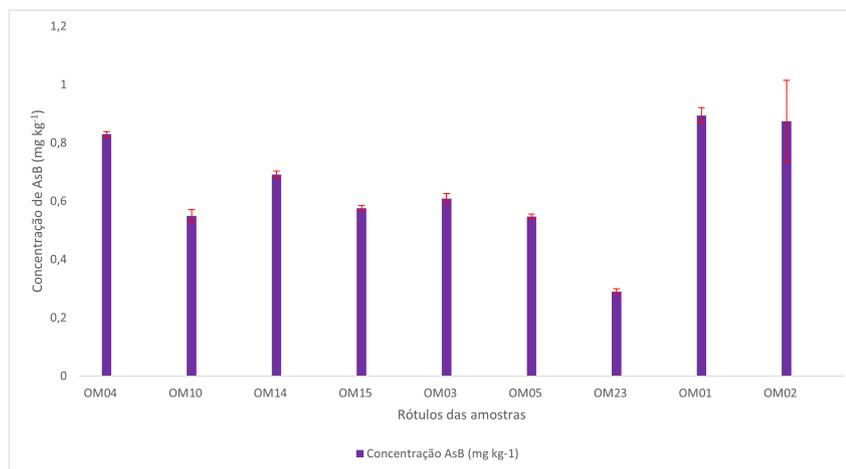


Figura 4.14: Concentração de AsB nas amostras com As total aproximadamente e acima de 0,8 mg kg⁻¹

Agora, com os dados apresentados de AsB acima, apresentou-se então os dados de As total realizados pelo método de GFAAS e AsB pelo método HPLC-UV-HG-AFS na figura 4.15 abaixo:

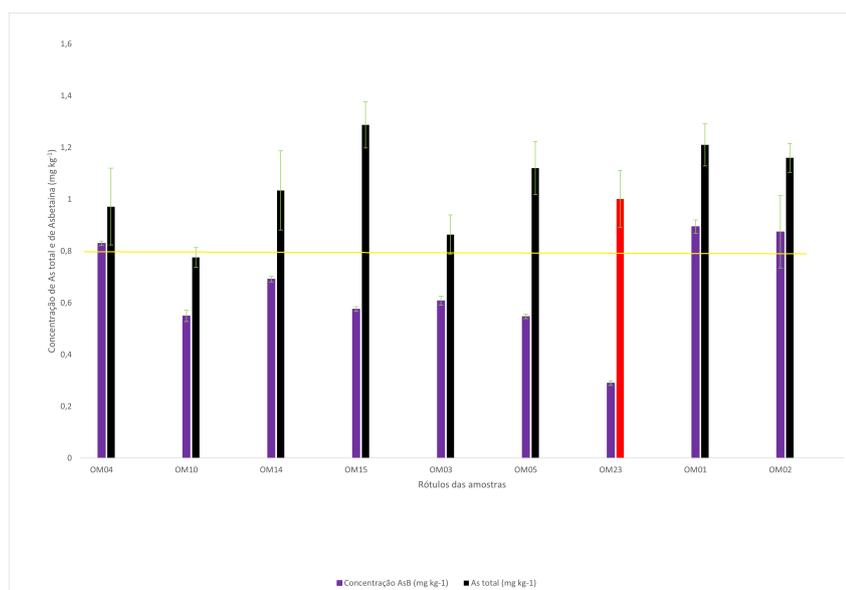


Figura 4.15: Comparação das concentrações de AsB e As total nas amostras de peixe. As barras em roxo representam a concentração de AsB. As barras pretas se referem à concentração de As total da espécie *Priacanthus Arenathus* da Região da Costa do Sol. As barras vermelhas representam a concentração de As total da espécie *Pomatomus Saltatrix* da Região da Costa do Sol

Os resultados acima mostram que a diferença entre AsB e As total é preocupante, em razão da possibilidade da existência de espécies orgânicas tóxicas de As e espécies inorgânicas, que bioacumulam no organismo do ser humano. Então, foi necessário fazer uma estimativa pessimista para entender a extensão do problema acima. A amostra OM023 apresentou uma diferença de As total e AsB de $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$, que pode ser referente a As tóxico.

4.5

Implicações na saúde dos seres vivos estimados pelo consumo de alimentos contendo As e uma estimativa de consumo com base no trabalho apresentado

As espécies de As se bioacumulam nos organismos vivos. Os peixes estão totalmente expostos à contínua contaminação por As em diferentes formas, e sofrem o efeito de bioacumulação. Então, quanto maior os peixes e a exposição, maior a quantidade de As bioacumulado. Abaixo, a figura 4.16 demonstra a consequência desse fenômeno:



Figura 4.16: Ilustração do efeito de bioacumulação nos peixes ao longo do tempo devido à exposição a As (arquivo pessoal)

Em outros países, há o limite de consumo de As tóxico por massa corporal e por dia. Para esse presente trabalho, buscou-se, então, relacionar a provável quantidade de As tóxico encontrada nos peixes pela diferença de As total e AsB com a quantidade de massa corporal média do homem e da mulher. Abaixo, segue um gráfico que estabelece a relação da massa média do homem e da mulher e a idade:

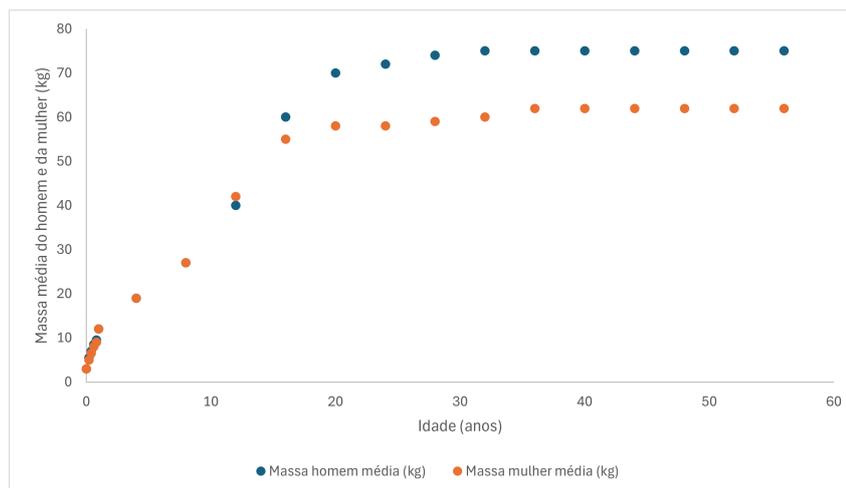


Figura 4.17: Gráfico adaptado de massa média do homem e da mulher. Adaptado de Report of the task group on reference man

(82)

Considerando o pior cenário de concentração de As tóxico proveniente da amostra OM23 desse trabalho exposta na figura 4.15, e considerando também o limites máximo e mínimo de massa média do homem e da mulher durante a vida, temos a seguinte situação: a massas médias durante a vida para o homem é de 75 kg e para a mulher, por sua vez, é de 62 kg. O pior cenário da concentração de As tóxico se refere à amostra OM23 de $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$. Convertendo essa possível quantidade de As tóxico para As tóxico ingerido por massa corporal ug kg^{-1} considerando-se 18,5 kg de peixe consumido por habitante ao ano no Rio de Janeiro⁽⁸³⁾, tem-se $0,47 \text{ ug kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de As tóxico ingerido para o homem com massa média de 75 kg e $0,57 \text{ ug kg}^{-1}$

dia⁻¹ para a mulher de 62 anos. Em países como Canadá, países do Reino Unido, Estados Unidos e Bélgica, os limites de As em peixe são definidos como 5,8 ug kg⁻¹ dia⁻¹, 5,6 ug kg⁻¹ dia⁻¹, 8,3 ug kg⁻¹ dia⁻¹ e 9,5 ug kg⁻¹ dia⁻¹, respectivamente. Esses limites desses países dizem respeito ao consumo diário e peso corporal, dando maior significado à verificação de contaminação causada pela exposição a alimentos que contenham esse contaminante. Em alguns países subdesenvolvidos, como Bangladesh, a exposição a As se deve à falta de saneamento básico, pelo consumo de água contaminada, com uma taxa de 56 ug kg⁻¹ dia⁻¹ de consumo de As. No entanto, em outros países, verifica-se que a via principal de exposição a As se deve por consumo de animais marinhos, principalmente peixes.⁽¹⁾

Baseando-se nesses índices, os pesquisadores estimaram uma taxa tolerável de consumo de As tóxico de 2 ug kg⁻¹ dia⁻¹.⁽¹⁾ Desse modo, sabendo que cada amostra de peixe do presente trabalho se refere ao filé do peixe estudado em si, não é possível dizer que o consumo desses peixes dessa região possa causar problemas de saúde para a população em decorrência de consumo de As tóxico, já que os valores encontrados de 0,47 ug kg⁻¹ dia⁻¹ de prováveis As tóxicos ingeridos para a massa média do homem de 75 kg e 0,57 ug kg⁻¹ dia⁻¹ para a mulher de massa média de 62 kg estão abaixo do recomendado pelos pesquisadores de 2 ug kg⁻¹ dia⁻¹ de peixe consumido.

Esses cenários foram considerados em razão de ser muito difícil de monitorar o consumo da população. É preciso entender se a população de grandes cidades costuma comer esses peixes e qual época do ano há a maior probabilidade de isso ocorrer.

Sem estimar quantidades ingeridas, pensa-se que numa família de dieta variável pode não estar em risco se consumir peixes esporadicamente. No entanto, famílias em comunidades ribeirinhas podem estar em risco elevado se dependerem somente de peixe como fonte de proteína, pois além da grande exposição ao As, há também exposição a outras espécies tóxicas de outros elementos como mercúrio e selênio.^(1, 84)

5

Conclusão

O procedimento de otimização do método GF-AAS com zeeman resultou na temperatura de pirólise como 1200 °C e a temperatura de atomização como 2300 °C, com o auxílio do modificador de paládio, Pd(NO₃)₂.

A exatidão do método foi avaliada através da análise das amostras de referência certificadas BCR-627 (músculo de atum) e DORM-2 (músculo de atum da espécie squalidae, um tipo de tubarão) e apresentou valores de recuperação entre 70 e 95%.

As medidas de concentração de As total nas amostras de *Priacanthus Arenatus* e *Pomatomus Saltatrix* foram obtidas pelo métodos de GFAAS indicou valores, em maioria, menores que o estabelecido para limite máximo 1 mg kg⁻¹ de As em peixes. No entanto, para a real avaliação de risco fatores como os hábitos alimentares dos grupos considerados críticos, como os pescadores, devem ser levados em consideração. Deve-se levar em consideração, também, o possível risco da população que costuma comer esses peixes. O governo não disponibiliza, por meio de nenhum meio, informações sobre pessoas que consomem peixes, a respeito de idade, gênero, etnia ou renda. E, além disso, tal limite máximo não pode ser o único fator de consideração de risco de consumo de peixes que contenham As, visto que esse elemento se acumula nos peixes, dependendo da forma que se encontra, como As inorgânicos e orgânicos tóxicos. Isso indica que, ao longo da vida, os consumidores podem estar expostos a doenças provocadas pela bioacumulação de espécies de peixe que contenham As, aumentando chances de desenvolvimento de câncer, doenças neuropáticas periféricas, doenças vasculares periféricas, doenças na bexiga e no pulmão.

A hipótese de haver maior concentração de As na região da Costa do Sol em decorrência do fenômeno Barreiras foi confirmada. Algumas apresentaram concentração próximas de 1 mg kg⁻¹, e a maioria dessas, com apresentação acima de 0,8 mg kg⁻¹. Tais medidas de concentração de amostras de peixe para *Priacanthus Arenathus* e *Pomatomus Saltatrix* foram, em média, o dobro daquelas encontradas para a espécie *Priacanthus Arenathus* da região da Costa Verde.

A curva analítica para AsB obtida pelo método HPLC-UV-HG-AFS apresentou boa linearidade e também bons parâmetros estatísticos de validação, incluindo sensibilidade analítica. Os índices de recuperação ficaram entre 85% e 90%.

As medidas de concentração encontradas para AsB variaram entre 70%

e 95% em relação a arsênio total. No entanto, tais medidas de concentração encontradas não significam a falta de necessidade de utilizar outros métodos analíticos para especificação e quantificação de As. Há a possibilidade de haver espécies tóxicas orgânicas de As como MMA, DMA e espécies inorgânicas, AsO_3 e As_2O_5 já muito conhecidas por serem mais tóxicas que as espécies tóxicas orgânicas.

Verificou-se que o pior cenário possível do presente trabalho, em que há a possibilidade de As tóxico inorgânico e/ou orgânico resultante da diferença de As total e AsB, não indica riscos de consumo de filés de peixe dessa região pela população. No entanto, é necessário que o governo melhor monitore sua população através de pesquisas de comportamento sobre o consumo de peixes.

6

Referências bibliográficas

- 1 BAYENS, W. et al. Arsenic enrichment in sediments and beaches of brazilian coastal waters: A review. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 681, p. 143–154, 2019.
- 2 MIRLEAN, N. et al. Sandy beaches contamination by arsenic, a result of nearshore sediment diagenesis and transport (brazilian coastline). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 135, p. 241–247, 2013.
- 3 NASCIMENTO, G. B. d. et al. Historical contamination with a current problem: Can mining tailings enhance coastal arsenic pollution? v. 20, n. 1, p. 159–168, 2024.
- 4 KURAIEM, B. P. et al. Nematode larvae infecting priacanthus arenatus cuvier, 1829 (pisces: Teleostei) in brazil. *Anuais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, n. 2, p. 857–863, 2016.
- 5 SERGIPENSE, S.; CARAMASCHI, E. P.; SAZIMA, I. Morfologia e hábitos alimentares de duas espécies de engraulidae (teleostei, clupeiformes) na baía de sepetiba, rio de janeiro. *Revista Brasileira de Oceanografia*, v. 47, n. 2, p. 173–188.
- 6 WOLLE, M. M.; D., C. S. Speciation analysis of arsenic in seafood and seaweed: Part ii-single laboratory validation of method. *Springerlink*, v. 410, n. 22, p. 5689–5702, 2018.
- 7 BARRA, C. M. et al. Especificação de arsênio - uma revisão. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 58–70, 2000.
- 8 GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsênio: uma revisão histórica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 1, p. 91–95, 2005.
- 9 JONES, F. A broad view of arsenic. *Poultry Science*, v. 86, n. 1, p. 2–14, 2007.
- 10 CHOU, C. H. S. J.; CHOU, J.; ROSA, C. T. D. Case studies – arsenic. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 206, n. 4, p. 381–386, 2003.
- 11 ACKLEY, K. et al. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by hplc-icp-ms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 14, p. 845–850, 1999.
- 12 JIA, Y. et al. Speciation analysis of six arsenic species in marketed shellfish: Extraction optimization and health risk assessment. *Elsevier Science*, v. 244, p. 311–316, 2017.
- 13 FRICKLE, M. W. et al. Extraction and detection of a new arsine sulfide containing arsenosugar in molluscs by ic-icp-ms and ic-esi-ms/ms. v. 19, n. 11, p. 1454–1459, 2004.

- 14 WU, Y. et al. Metabolic and residual characteristics of different arsenic species contained in laver during mouse digestion. *Science of the total environment*, v. 793, p. 148–434, 2021.
- 15 S., H.; H., T. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by hplc-icp-ms. v. 383, p. 454–600, 2005.
- 16 LARSEN, E. H. et al. Determination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and hplc-icp-ms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, p. 339–460, 2005.
- 17 MARTINSON, C. A.; REDDY, K. Adsorption of arsenic(III) and arsenic(v) by cupric oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 336, n. 2, p. 406–411, 2009.
- 18 ALMELA, C. et al. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. v. 44, n. 11, p. 1901–1908, 2006.
- 19 WILLIAMS, P. N. et al. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 15, p. 5531–5540, 2005.
- 20 LAI, Y. et al. Inorganic arsenic speciation analysis in food using hplc/icp-ms: Method development and validation. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 30, n. 4, p. 644–653, 2022.
- 21 HIROSHI, N.; WATARU, H. Biological oxidation of arsenite in strong acid water. *J-STAGE*, v. 54, n. 4, p. 182–186, 2007.
- 22 SUAREZ, C. A. *Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2010.
- 23 GONG, Z. Arsenic speciation analysis. *Talanta*, v. 58, n. 1, p. 77–96, 2002.
- 24 LINDEMANN, T. et al. Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using hplc/icp-ms. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, v. 368, p. 214–20, 2012.
- 25 IARC. *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. [S.l.]: World Health Organization, 2012.
- 26 BYRD, D. M. et al. Carcinogenic risks of inorganic arsenic in perspective. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 96, p. 484–494, 1996.
- 27 BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em ouro preto e Mariana, quadrilátero ferrífero (mg). *Revista Escola de Minas*, v. 57, n. 1, p. 45–51, 2004.
- 28 BORBA, R. P. et al. Estudo da especiação de arsênio inorgânico e determinação de arsênio total no monitoramento ambiental da qualidade de águas subterrâneas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 970–975, 2009.

- 29 MASUDA, H. Arsenic cycling in the earth's crust and hydrosphere: interaction between naturally occurring arsenic and human activities. *Progress in Earth and Planetary Science*, v. 5, n. 1, p. 68, 2018.
- 30 SINGH, N. et al. Decoding the pathways of arsenic biotransformation in bacteria. *Environmental Sustainability*, v. 4, n. 1, p. 63–85, 2021.
- 31 BHATTACHARYA, P. et al. Arsenic in the environment: Biology and chemistry. *Science of The Total Environment*, v. 379, n. 2, p. 109–120, 2007.
- 32 PATAÇA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-x por energia dispersiva. v. 28, n. 4, p. 579–582, 2005.
- 33 AGUILAR, N. C. *Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Arsênio com Potencial de Aplicação em Processos de Biorremediação*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, 2018.
- 34 CULLEN, W. R.; REIMER, K. J. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, v. 89, n. 4, p. 713–764, 1989.
- 35 WANG, P. et al. A review on completing arsenic biogeochemical cycle: Microbial volatilization of arsines in environment. *Journal of Environmental Sciences*, v. 26, n. 2, p. 371–381, 2014.
- 36 CASTELLO, J. P.; KRUG, L. C. *Introdução à ciência do mar*. [S.l.]: Editora textos, 2017.
- 37 TAYLOR, V. et al. Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Science of The Total Environment*, v. 580, p. 266–282, 2017.
- 38 GARCÍA-SALGADO, S.; QUIJANO, M. A.; BONILLA, M. M. Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 714, p. 38–46, 2012.
- 39 EDMONDS, J. S.; FRANCESCONI, K. A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, v. 43, n. 5, p. 553–557, 1987.
- 40 ANDREWES, P. et al. Do arsenosugars pose a risk to human health? the comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar. *Environmental Science & Technology*, v. 38, n. 15, p. 4140–4148, 2004.
- 41 PERSHAGEN, G. The carcinogenicity of arsenic. *Environmental Health Perspectives*, v. 40, p. 93–100, 1981.
- 42 CANNON, J. R. et al. Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *panulirus longype cygnus george*. v. 16, p. 1543–1546, 1977.
- 43 FARIAS, J. d. S. et al. Especificação química de arsênio inorgânico no estuário da laguna dos patos (rs, brasil). v. 35, n. 7, p. 1401–1406, 2012.

- 44 BRASIL. Resolucao - rdc n 42: Ministério da saúde. 2013.
- 45 SAHA, J. et al. A review of arsenic poisoning and its effects on human health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology - CRIT REV ENVIRON SCI TECHNOL*, v. 29, p. 281–313, 1999.
- 46 LONG, H.; NELSON, L. S. Metals and metalloids. In: _____. *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide*. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2016.
- 47 KHAN, M. I. et al. Arsenic exposure through dietary intake and associated health hazards in the middle east. *Nutrients*, v. 14, n. 10, 2022.
- 48 TAIB, M. M.; LIM, L. Simultaneous microwave digestion for total arsenic and inorganic arsenic in local shrimp and prawn commodities of brunei darussalam for regulatory and safety monitoring. *Heliyon*, v. 10, n. 11, p. 1–14, 2024.
- 49 AGNIESKA, N. et al. Simple and reliable determination of total arsenic and its species in seafood by icp-ms and hplc-icp-ms. *Food Chemistry*, v. 379, p. 1–10, 2022.
- 50 LE, D.; PHAN, T. L.; H., T. Q. Validation of an analytical method for the determination of inorganic, organic, and total arsenic in fish sauce based on hydride generation atomic absorption spectrometry. *International Food Research Journal*, v. 28, n. 6.
- 51 HWANG, I. M. et al. Determination of toxic elements and arsenic species in salted foods and sea salt by icp–ms and hplc–icp–ms. *ACS Omega*, v. 6, n. 30, p. 19427–19434, 2021.
- 52 TÜRKMEN, M. et al. Determination of metal contaminations in sea foods from marmara, aegean and mediterranean seas: Twelve fish species. *Food Chemistry*, v. 108, n. 2, p. 794–800, 2008.
- 53 SCHMIDT, L. et al. Arsenic speciation in seafood by lc-icp-ms/ms: method development and influence of culinary treatment. *J. Anal. At. Spectrom.*, The Royal Society of Chemistry, v. 32, p. 1490–1499, 2017.
- 54 SILVA, T. et al. Spectrometric method for determination of inorganic contaminants (arsenic, cadmium, lead and mercury) in smooth weakfish fish. *LWT - Food Science and Technology*, v. 76, p. 87–94, 2017.
- 55 KOESMAWATI, T. et al. Sample preparation methods for organic arsenic species (arsenobetain, $(\text{ch}_3)_3\text{as}^+\text{ch}_2\text{coo}$) in tuna fish samples followed by hg-qfaas, gf-aas, and icp-ms measurements. *Procedia Chemistry*, v. 17, p. 200–206, 12 2015.
- 56 KOMOROWICZ, I.; SAJNÓG, A.; BARAŃKIEWICZ, D. Total arsenic and arsenic species determination in freshwater fish by icp-drc-ms and hplc/icp-drc-ms techniques. *Molecules*, v. 24, n. 3, 2019.

- 57 PANHWAR, A. H.; TUZEN, M.; KAZI, T. G. Choline chloride–oxalic acid as a deep eutectic solvent–based innovative digestion method for the determination of selenium and arsenic in fish samples. v. 101, n. 4, p. 1183–1189.
- 58 ZMOZINSKI, A. V. et al. Direct solid sample analysis with graphite furnace atomic absorption spectrometry—a fast and reliable screening procedure for the determination of inorganic arsenic in fish and seafood. *Talanta*, v. 134, p. 224–231, 2015.
- 59 PEREIRA Éderson R. et al. Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 150, p. 142–147, 2016.
- 60 KALANTZI, I. et al. Arsenic speciation in fish from greek coastal areas. *Journal of Environmental Sciences*, v. 56, p. 300–312, 2017.
- 61 POLAK-JUSZCZAK, L.; RICHERT, J. S. Arsenic speciation in fish from baltic sea close to chemical munitions dumpsites. *Chemosphere*, v. 284, p. 131326, 2021.
- 62 JUNCOS, R. et al. Interspecific differences in the bioaccumulation of arsenic of three patagonian top predator fish: Organ distribution and arsenic speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 168, p. 431–442, 2019.
- 63 NOGUEIRA, R. et al. Arsenic speciation in fish and rice by hplc-icp-ms using salt gradient elution. *Journal of the Brazilian Chemical Society, Sociedade Brasileira de Química*, v. 29, n. 8, p. 1593—1600.
- 64 ÖZCAN, S. B. Şefika; ATAMAN, O. Y. Speciation of arsenic in fish by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Letters*, v. 49, n. 15, p. 2501–2512, 2016.
- 65 SILVA, M. S. et al. Arsenic speciation and arsenic feed-to-fish transfer in atlantic salmon fed marine low trophic feeds based blue mussel and kelp. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 80, p. 127319, 2023.
- 66 HOYNE, T. F. M. et al. Arsenic speciation in canned tuna fish samples (thunnus) using ionic chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 116, p. 105051, 2023.
- 67 CHEN, Y.-C.; JIANG, S.-J. Simultaneous speciation of arsenic and mercury in fish by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, The Royal Society of Chemistry, v. 36, p. 938–945, 2021.
- 68 GAO, Y. et al. Arsenic speciation in fish and shellfish from the north sea (southern bight) and açu port area (brazil) and health risks related to seafood consumption. *Chemosphere*, v. 191, p. 89–96, 2018.

- 69 RAN, M. et al. Characteristics of arsenic speciation in mainly cultured shellfish from sanmen bay, zhejiang province, china. *Marine Pollution Bulletin*, v. 197, p. 115793, 2023.
- 70 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, v. 32, p. 1278–1287, 2009.
- 71 JCROUCH, S. R.; WEST, D. M.; SKOOG, D. A. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. [S.l.: s.n.], 2008. 1026 p.
- 72 SKOOG et al. *Fundamentos de química analítica*. [S.l.: s.n.], 2006.
- 73 ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. [S.l.: s.n.], 2020.
- 74 WILLIAMSON, D. F.; PARKER, R. A. The box plot: A simple visual method to interpret data. *Annals of Internal Medicine*, v. 110, n. 11, 1989.
- 75 SOUZA, A. O. d. et al. Determinação de cd e pb em amostras de goma xantana por gf aas. *Química Nova*, v. 38, n. 2, 2015.
- 76 ATOMIC Absorption Spectrometry. 3. ed. [S.l.]: Wiley, 1999.
- 77 LECTROTHERMAL Atomization for Analytical Atomic Spectrometry. [S.l.]: Wiley, 1999.
- 78 FRESCHI, G. P. G. et al. Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações. *Eclética Química*, v. 25, p. 213–226, 2000.
- 79 OSHITA, D. et al. Determinação direta e simultânea de al, as, fe, mn e ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Eclética Química*, v. 28, n. 1, p. 91–96, 2003.
- 80 FROES, R. E. S.; CARVALHINHO, W. C.; SILVA, J. B. B. d. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Revista Analytica*, n. 26, p. 32–43, 2006.
- 81 PÉTURSDÓTTIR, A. H. et al. Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter? v. 150, p. 353–359, 2014.
- 82 S., S. W. et al. *Report of the Task Group on Reference Man of Committee 2 of the International Commission Radiological Protection*. [S.l.]: Pergamon Press, 1974. 8–26 p.
- 83 MACIEL, E. S.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. *A complexa avaliação do consumo e pescado*. 2012. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va11-mercado-e-consumo02.pdf>>.
- 84 BEZERRA, F. H. R.; MELLO, C. L.; SUGUIO, K. A formação barreiras: Recentes avanços e antigas questões. *Geologia USP – Série Científica*, 2006.

ANEXO A

Dados utilizados para construção da curva analítica por GFAAS

Concentração	Sinal bruto	Sinal líquido	Desvio padrão relativo	Desvio padrão	Média
0	0,0042	0			
0	0,0049	0			
0	0,0028	0	0	0	0
10	0,0385	0,0343			
10	0,0385	0,0336			
10	0,0391	0,0363	4,034136	0,001401	0,034733
20	0,0655	0,0613			
20	0,0678	0,0629			
20	0,067	0,0642	2,313032	0,001453	0,0628
30	0,0936	0,0894			
30	0,0951	0,0902			
30	0,0987	0,0959	3,859687	0,003544	0,091833
40	0,1227	0,1185			
40	0,1225	0,1176			
40	0,124	0,1212	1,573047	0,001873	0,1191
50	0,1505	0,1463			
50	0,1516	0,1467			
50	0,1489	0,1461	0,208726	0,000306	0,146367

Dados utilizados para construção da curva analítica por HPLC-UV-GF-AFS

Conc (ug/L)	Sinal de fluorescência	média	Desvio padrão	Desvio padrão relativo
5	93,614	93,6554168	2,222152371	2,37268964
5	96,776			
5	90,223			
5	94,556			
5	92,3311008			
5	94,4324			
10	187,896895	186,4612705	2,601321436	1,395100135
10	188,32424			
10	185,37			
10	188,35			
10	182,3652176			
10	165,77			
15	324,3393305	324,7776054	0,281573125	0,086697211
15	325,032092			
15	324,76			
15	324,99			
15	324,55521			
15	324,989			
20	419,7108167	418,8969458	1,078036931	0,257351347
20	419,78762			
20	420,1			
20	418			
20	417,6892378			
20	418,094			
25	493,5637837	493,107617	1,127768969	0,228706459
25	493,999			
25	493,56			
25	492,1			
25	491,3289184			
25	494,094			
50	1036,582745	1034,726489	1,447327375	0,139875357
50	1035,4777			
50	1034,8			
50	1033			
50	1035,47849			
50	1033,02			

Equações utilizadas e dados utilizados para obtenção da curva analítica completa, limites de detecção e quantificação e resíduos

Sensibilidade

$m = \text{Variação do sinal} / \text{Variação da concentração}$

Centróides

$X_m = \sum x_i / \text{réplicas}$

$Y_m = \sum y_i / \text{réplicas}$

$m = (\sum (x_i - X_m)(y_i - Y_m)) / (\sum (x_i - X_m)^2)$

Curva analítica normal

$Y_m = mX_m$

Desvio padrão residual e desvio padrões do intercepto e de m

$S_{y/x} = ((\sum (y_i - y_i \text{ projetado})^2) / (n - 2))^{1/2}$ onde n = réplicas

$S_m = S_{y/x} / (\sum (x_i - X_m)^2)^{1/2}$

$S_b = S_{y/x} (\sum x_i^2 / n - (\sum x_i)^2 / n^2)^{1/2}$

Equação da curva analítica completa

$Y = (m \pm s_m)x + (b \pm s_b)$

$LD = 3,3 * s_b / m$

$LQ = 10 * s_b / m$

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR[®] – 627

CERTIFICATE OF ANALYSIS

TUNA FISH TISSUE			
	Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of data p
	Certified value ¹⁾	Uncertainty ²⁾	
Arsenobetaine	52 $\mu\text{mol/kg}$	3 $\mu\text{mol/kg}$	6
Dimethylarsinic acid	2.0 $\mu\text{mol/kg}$	0.3 $\mu\text{mol/kg}$	6
Total arsenic	4.8 mg/kg	0.3 mg/kg	9

1) The certified value is the unweighted mean of the means of p sets of results. These sets of results were provided by different laboratories and different methods. The certified value is traceable to the International System of Units (SI).
2) The uncertainty is taken as the half-width of the 95 % confidence interval of the mean value (1).

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 300 mg.

Indicative Values		
Element	Mass fraction based on dry mass	
	Indicative value ¹⁾	Uncertainty ²⁾
Ho	1.8 $\mu\text{g/kg}$	0.6 $\mu\text{g/kg}$
Sc	8.5 $\mu\text{g/kg}$	1.8 $\mu\text{g/kg}$
Yb	2.8 $\mu\text{g/kg}$	0.5 $\mu\text{g/kg}$
As	7.1 mg/kg	0.5 mg/kg
Cd	0.275 mg/kg	0.011 mg/kg
Cr	0.37 mg/kg	0.06 mg/kg
Cs	13.8 ³⁾ $\mu\text{g/kg}$	1.5 $\mu\text{g/kg}$
Mo	1.99 ³⁾ mg/kg	0.15 mg/kg
Zn	70.7 mg/kg	0.4 mg/kg

1) Mean value
2) Standard deviation
3) Based on all individual data



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR[®] – 668

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Table 1. Certified Concentrations for Selected Inorganic Constituents in SRM 2976 (Dry-Mass Basis)

Element	Mass Fraction ^(a) (mg/kg)
Arsenic (As)	13.3 \pm 1.8
Cadmium (Cd)	0.82 \pm 0.16
Copper (Cu)	4.02 \pm 0.33
Iron (Fe)	171.0 \pm 4.9
Lead (Pb)	1.19 \pm 0.18
Selenium (Se)	1.80 \pm 0.15
Zinc (Zn)	137 \pm 13

National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 2976

ANEXO E

Grubbs' critical value table:

N	0.1	0.075	0.05	0.025	0.01		N	0.1	0.075	0.05	0.025	0.01
3	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15		53	0	0	2.981	3.151	999
4	1.42	1.44	1.46	1.48	1.49		54	0	0	2.988	3.158	999
5	1.6	1.64	1.67	1.71	1.75		55	0	0	2.995	3.165	999
6	1.73	1.77	1.82	1.89	1.94		56	0	0	3.002	3.172	999
7	1.83	1.88	1.94	2.02	2.1		57	0	0	3.009	3.179	999
8	1.91	1.96	2.03	2.13	2.22		58	0	0	3.016	3.186	999
9	1.98	2.04	2.11	2.21	2.32		59	0	0	3.023	3.193	999
10	2.03	2.1	2.18	2.29	2.41		60	0	0	3.03	3.2	999
11	2.09	2.14	2.23	2.36	2.48		61	0	0	3.036	3.206	999
12	2.13	2.2	2.29	2.41	2.55		62	0	0	3.042	3.212	999
13	2.17	2.24	2.33	2.46	2.61		63	0	0	3.048	3.218	999
14	2.21	2.28	2.37	2.51	2.66		64	0	0	3.054	3.224	999
15	2.25	2.32	2.41	2.55	2.71		65	0	0	3.06	3.23	999
16	2.28	2.35	2.44	2.59	2.75		66	0	0	3.066	3.236	999
17	2.31	2.38	2.47	2.62	2.79		67	0	0	3.072	3.242	999
18	2.34	2.41	2.5	2.65	2.82		68	0	0	3.078	3.248	999
19	2.36	2.44	2.53	2.68	2.85		69	0	0	3.084	3.254	999
20	2.38	2.46	2.56	2.71	2.88		70	0	0	3.09	3.26	999
21	0	0	2.58	2.73	2.91		71	0	0	3.095	3.265	999
22	0	0	2.6	2.76	2.94		72	0	0	3.1	3.27	999
23	0	0	2.62	2.78	2.96		73	0	0	3.105	3.275	999
24	0	0	2.64	2.8	2.99		74	0	0	3.11	3.28	999

25	0	0	2.66	2.82	3.01		75	0	0	3.115	3.285	999
26	0	0	2.68	2.84	999		76	0	0	3.12	3.29	999
27	0	0	2.7	2.86	999		77	0	0	3.125	3.295	999
28	0	0	2.72	2.88	999		78	0	0	3.13	3.3	999
29	0	0	2.73	2.9	999		79	0	0	3.135	3.305	999
30	0	0	2.75	2.91	999		80	0	0	3.14	3.31	999
31	0	0	2.76	2.93	999		81	0	0	3.144	3.314	999
32	0	0	2.78	2.95	999		82	0	0	3.148	3.318	999
33	0	0	2.79	2.96	999		83	0	0	3.152	3.322	999
34	0	0	2.81	2.97	999		84	0	0	3.156	3.326	999
35	0	0	2.82	2.98	999		85	0	0	3.16	3.33	999
36	0	0	2.83	2.992	999		86	0	0	3.164	3.334	999
37	0	0	2.84	3.004	999		87	0	0	3.168	3.338	999
38	0	0	2.85	3.016	999		88	0	0	3.172	3.342	999
39	0	0	2.86	3.028	999		89	0	0	3.176	3.346	999
40	0	0	2.87	3.04	999		90	0	0	3.18	3.35	999
41	0	0	2.88	3.05	999		91	0	0	3.183	3.353	999
42	0	0	2.89	3.06	999		92	0	0	3.186	3.356	999
43	0	0	2.9	3.07	999		93	0	0	3.189	3.359	999
44	0	0	2.91	3.08	999		94	0	0	3.192	3.362	999
45	0	0	2.92	3.09	999		95	0	0	3.195	3.365	999
46	0	0	2.928	3.098	999		96	0	0	3.198	3.368	999
47	0	0	2.936	3.106	999		97	0	0	3.201	3.371	999
48	0	0	2.944	3.114	999		98	0	0	3.204	3.374	999
49	0	0	2.952	3.122	999		99	0	0	3.207	3.377	999
51	0	0	2.967	3.137	999		100	0	0	3.21	3.38	999

52	0	0	2.974	3.144	999
----	---	---	-------	-------	-----

Fonte: Standard practices for dealing with outlying observations (2021) - ASTM International