



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**CAMPUS CATALÃO**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-  
Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em  
Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de  
Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite**

**Bruno Elias dos Santos Costa**

**Orientadora:** Profa. Dra. Luciana Melo Coelho

Catalão, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**CAMPUS CATALÃO**

Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado

Bruno Elias dos Santos Costa

**Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-  
Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em  
Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de  
Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora:** Profa. Dra. Luciana Melo Coelho

Catalão, 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BSCAC/UFG**

C837e

Costa, Bruno Elias dos Santos.

Extração seletiva por ponto nuvem para pré-concentração e especiação de arsênio inorgânico em matriz alimentícia empregando espectrometria de absorção atômica eletrotérmica em forno de grafite [manuscrito] / Bruno Elias dos Santos Costa. - 2013.

85 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Melo Coelho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, Departamento de Química, 2013.

Bibliografia.

1. Arsênio Inorgânico. Extração por Ponto Nuvem. 3. Forno Gráfico. I. Título.

CDU: 542.9



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de  
Dissertação de Mestrado do candidato Bruno Elias dos Santos Costa, realizada em 29  
de julho de 2013.*

Prof. Dra. Luciana Melo Coelho

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Prof. Dra. Sílvia de Sousa Freitas

## DEDICO

Àquele que tem sonhos  
infinatamente maiores do que os  
meus!

PAI e MÃE: *Garra, Amor e Fé!*

Aos que valorizam a Educação e  
praticam o conhecimento científico para  
um bem melhor e maior!

Amigos muito especiais  
que me mostraram que ainda  
existem pessoas  
feitas de Amor!

*Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse amor, nada seria.*

*O Amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso, não trata com leviandade, não se ensoberbece. O amor tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O Amor nunca falha...*

1 Coríntios 13

*Os que semeiam com lágrimas um dia, voltarão com alegria!*

Salmo 126,6

*O final é mais do que o começo...*

Eyshila

## AGRADECIMENTOS

À Deus, toda honra e glória! Se consegui chegar até aqui é por toda força que me proporcionaste. Obrigado pela Tua presença em minha vida todos os momentos!

Aos meus pais Célio e Édna, que abraçaram esse desafio junto comigo! Tanto amor e dedicação, que apesar dos momentos mais difíceis me fizeram sentir a pessoa mais especial do mundo. Obrigado pela compreensão. Guerreiros admiráveis e exemplo de vida!

Ao meu irmão Tiago, meu braço direito e companheiro sempre disposto a me ajudar! Te amo, mano!

À todos os meus familiares pelo carinho, incentivo e apoio! Aos primos, tios e avós. Lidiane, prima e colega, agradeço pelas vezes em que me recebeu em seu apartamento e Isabest cousin, te amo!

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Melo Coelho por todo aprendizado, dedicação, profissionalismo, paciência e amizade! Muito Obrigado!

À Profa. Dra. Nívia Maria Melo Coelho (UFU), que durante todo o tempo que estive em Uberlândia, me acolheu em seu laboratório, deixando a infra-estrutura necessária à disposição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Espectroscopia Aplicada (UFU): Ione, Hélen, Vanessa, Simone, Sângela, Fernanda, Eliezer, Dayene, Thays, Sol e Thiago. Obrigado pela contribuição científica, pelos momentos de descontração e amizade e pelas apetitosas tardes de quarta-feira!

Aos colegas da UFG que ainda caminham comigo desde a graduação: Sandra, Maysa, Marcos, Gracy, Afif, Glenda, João Gabriel e companhia. Contem comigo sempre! Mel, a amizade supera a distância!

Jane (Janusca the best), obrigado por ser quem você é! Caminhamos juntos até aqui, caminharemos juntos pra sempre! Os momentos da sua presença foram imprescindíveis! Quantas descobertas sensacionais né! rrsrs

Aos amigos de fé, que intercederam em meu favor! Obrigado por acreditarem em mim!

Gabriela, obrigado pela ajuda profissional!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e disporem gentilmente à avaliar este trabalho! Obrigado pelas ricas contribuições.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Química da UFG-CAC.

A todos que de alguma forma, lançaram alguma contribuição para o desenvolvimento deste trabalho! Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

### **Extração Seletiva por Ponto Nuvem para Pré-Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite**

Neste estudo, foi desenvolvido um procedimento altamente sensível e seletivo para determinação de As(V) e arsênio total em amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após extração por ponto nuvem As(V)-CPE-GF AAS. O procedimento é baseado na formação do complexo de íons As(V) com molibdato na presença de 50,0 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico e 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. O complexo As(V)-molibdato foi extraído para fase rica em surfactante da solução de 0,06 % m/v de Triton X-114. As variáveis que afetam a formação do complexo, extração e a separação de fases, tais como a concentração do agente complexante, concentração do agente redutor e a concentração do eletrólito foram otimizadas utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta por meio do planejamento composto central (CCD). Sobre as condições otimizadas, a curva de calibração foi linear na faixa de 0,03 – 10,0 µg L<sup>-1</sup> para íons As(V). Os limites de detecção e quantificação alcançados para As(V) foram 0,0099 e 0,0331 µg L<sup>-1</sup> respectivamente, obtendo um fator de enriquecimento de 78,3 e o valor correspondente ao desvio padrão relativo (D.P.R.) para 10 replicatas foram abaixo de 5%. Um planejamento experimental fatorial de dois níveis envolvendo três fatores (modificadores permanentes, temperatura de pirólise TP e temperatura de atomização TA) foi investigado para estimar os valores ótimos das variáveis que afetam a detecção. Foi demonstrado que o modificador permanente de irídio e a interação TPxTA foram considerados na modelagem da superfície de resposta. Valores de recuperação foram obtidos entre 90,85% à 113,10% para amostras fortificadas. O método foi aplicado satisfatoriamente para a determinação de As(V) e arsênio total em algumas amostras de arroz beneficiadas na região.

Palavras-chave: Arsênio, Extração por Ponto Nuvem, Arroz, Forno de Grafite.

## ABSTRACT

### Selective Extraction by Cloud Point for Preconcentration and Speciation of Inorganic Arsenic in Food using Graphite Furnace Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy

In this study, a highly sensitive and selective procedure for determination of arsenate and total arsenic in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry after cloud point extraction As(V)-CPE-GF AAS was developed. The procedure is based on complex formation of As (V) ions with molybdate in the presence of 50.0 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid and 0.1 mmol L<sup>-1</sup> ascorbic acid. The complex of As (V)-molybdate was extracted into the surfactant-rich phase of 0.06% w/v Triton X-114 solution. The variables affecting complex formation, extraction and phase separation such as complexing agent concentration, reducing agent concentration and electrolyte concentration were optimized using a factorial design and response surface methodology through central composite design (CCD). Under the optimal experimental conditions, the calibration graph was linear in the range of 0.03 – 10.0 µg L<sup>-1</sup> for As (V) ions. The detection and quantification limits for As(V) were 0.0099 and 0.0331 µg L<sup>-1</sup> respectively, obtaining an enrichment factor of 78.3 and the corresponding value for relative standard deviation (R.S.D) for 10 replicate determinations was below 5%. A two-level full factorial experimental design involving three factors (permanent modifiers, pyrolysis temperature PT and atomization temperature AT) was investigated to estimate the optimum values of the variables affecting the detection. It was demonstrated that iridium modifier and PT x AT interaction were considered in modeling the response surface. Recovery values were obtained between 90.8% and 113.1% for spiked samples. The method was successfully applied to the determination of As (V) and total arsenic in some rice samples.

**Keywords:** Arsenic, Cloud Point Extraction, Food, ETAAS

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AOAC</b>	Associação Oficial de Química Analítica
<b>APDC</b>	Pirrolidina ditiocarbamato de amônio
<b>AsB</b>	Arsenobetaína
<b>AsC</b>	Arsenocolina
<b>As<sub>t</sub></b>	Arsênio Total
<b><sub>i</sub>As</b>	Arsênio Inorgânico
<b><sub>sp</sub>As</b>	Espécies de Arsênio com excessão de As(V)
<b>CCD</b>	Planejamento Composto Central
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>CPE</b>	Extração por Ponto Nuvem
<b>DLLME</b>	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>DMA</b>	Dimetilarsínico
<b>ETAAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica
<b>FAAS</b>	Especetrometria de Absorção Atômica por Chama
<b>FE</b>	Fator de Enriquecimento
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo
<b>GF AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite
<b>HG AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente.
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente.
<b>MMA</b>	Monometilarsônio
<b>MSMA</b>	Metano arsenato monossódico
<b>OMS (WHO)</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RSM</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>rpm</b>	Rotações por minuto

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b> Publicações de artigos entre 1982 e 2012 relacionando o uso da extração por ponto nuvem e a determinação mediante técnicas de espectroscopia atômica.....	4
<b>FIGURA 2.1</b> Principais espécies de arsênio biodisponíveis no ambiente, com interesse em estudos de especiação.....	6
<b>FIGURA 2.2</b> (A) Estrutura química do aditivo Roxarsone <sup>®</sup> (ácido 3-nitro-4-hidróxifenilarsênico); (B) Estrutura química do aditivo Daconate <sup>®</sup> (MSMA).....	8
<b>FIGURA 2.3</b> Representação esquemática do equilíbrio de formação das micela.....	16
<b>FIGURA 2.4</b> Processo de formação do ponto nuvem aplicado na extração e pré-concentração de um íon metálico.....	17
<b>FIGURA 2.5</b> Estrutura química do surfactante Triton X-114.....	17
<b>FIGURA 2.6</b> Publicações de artigos entre 1982 e 2012 relacionados com a pré-concentração dos elementos citados mediante CPE. Ln: Lantanídeos.....	18
<b>FIGURA 2.7</b> Visão longitudinal do sistema atomizador de um forno de grafite.....	20
<b>FIGURA 2.8</b> Etapas constituintes de um programa de temperatura em GF AAS.....	21
<b>FIGURA 2.9</b> Posicionamento do capilar do amostrador automático no interior do tubo de grafite, visualização através de um sistema de vídeo incorporado no espectrômetro de absorção atômica.....	22
<b>FIGURA 2.10</b> Planejamentos compostos centrais: (A) $J = 2$ e $\alpha = 1.414 (\approx \sqrt{2})$ , (B) $J = 3$ e $\alpha = 1.682$ . Os diferentes símbolos significam: (•) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (○) ponto central.....	27
<b>FIGURA 2.11</b> Estrutura genérica para a classificação de Keggin, como $H_3X^{n+}M_{12}O_{40}$ , em que $X = P, As$ e $M = Mo, W$ .....	30
<b>FIGURA 2.12</b> Espectro de absorção do complexo azul de molibdato após extração por ponto nuvem: (A) Branco; (B) Amostra.....	31
<b>FIGURA 4.1</b> (A) Tubos de grafite com plataforma de L'vov integrada e temperatura estabilizada (STPF), (B) Corte transversal e (C) Visão longitudinal.....	36
<b>FIGURA 4.2</b> (A) Formação do complexo azul de molibdato. (B) Adição do Triton X-114 e do NaCl após a formação do complexo. (C) Após centrifugação, com a	

separação definida das fases rica e aquosa. <b>(D)</b> Após a adição do diluente e pronto para ser injetado no GF AAS.....	38
<b>FIGURA 4.3</b> Pipetador automático do equipamento GF AAS recolhendo a amostra presente nos “vials” do auto-amostrador.....	39
<b>FIGURA 4.4</b> Injeção da amostra no atomizador eletrotérmico do forno de grafite.....	39
<b>FIGURA 4.5</b> Fluxograma das etapas de preparo das amostras de arroz para extração, pré-concentração e especiação de arsênio inorgânico.....	49
<b>FIGURA 5.1</b> Sinal transiente atômico (---) e de fundo (---) para o As(V) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ após extração por ponto nuvem empregando irídio como modificador permanente.....	50
<b>FIGURA 5.2</b> Sinal transiente atômico (---) e de fundo (---) para o As(V) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ após extração por ponto nuvem empregando nióbio como modificador permanente.....	51
<b>FIGURA 5.3</b> Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial $2^3$ completo para o programa de temperatura.....	52
<b>FIGURA 5.4</b> Superfície de resposta TP x TA x ABS. integrada obtido pelo CCD...	54
<b>FIGURA 5.5</b> Estudo do efeito do pH sobre a extração de As(V) por ponto nuvem..	56
<b>FIGURA 5.6</b> Diagrama de distribuição das espécies de As(V) em função do pH.....	57
<b>FIGURA 5.7</b> Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial $2^4$ completo para o sistema As(V)-CPE-GF AAS.....	61
<b>FIGURA 5.8</b> Superfície de resposta obtido pelo CCD para [Molib] x [HAsc] x Abs. Integrada, mantendo [NaCl] fixo em $0,008\% \text{ mv}^{-1}$ .....	64
<b>FIGURA 5.9</b> Superfície de resposta obtido pelo CCD para [Molib] x [NaCl] x Abs. Integrada, mantendo [HAsc] fixo em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	64
<b>FIGURA 5.10</b> Superfície de resposta obtido pelo CCD para [HAsc] x [NaCl] x Abs. Integrada, mantendo [HAsc] fixo em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , mantendo [Molib] fixo em $0,85 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	65
<b>FIGURA 5.11</b> Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ de resolução IV para o estudo do efeito de íons interferentes sobre as condições otimizadas de extração e detecção.....	68
<b>FIGURA 5.12</b> Resultados obtidos por análise direta em GF AAS, sem o	

procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem.....	69
<b>FIGURA 5.13</b> Resultados obtidos com a extração e pré-concentração por ponto nuvem para verificação da seletividade do método proposto.....	70
<b>FIGURA 5.14</b> Curva de calibração com As(V) obtida com o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem.....	71
<b>FIGURA 5.15</b> Curva de calibração para As(V) obtida sem o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem.....	72
<b>FIGURA 5.16</b> Sinais transientes para As(V) obtidas dentro da faixa de trabalho sob as condições validadas.....	73
<b>FIGURA 5.17</b> Focalização do posicionamento das amostras nos banhos de ultra-som por meio do teste do papel alumínio.....	74
<b>FIGURA 5.18</b> (A) Amostra de arroz em meio extrator de ácido nítrico e (B) após ser submetida à extração assistida por ultra-som.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 2.1</b> Teor de minerais encontrados na composição química em arroz integral e branco polido.....	11
<b>TABELA 2.2</b> Limite máximo de tolerância para arsênio em alimentos.....	12
<b>TABELA 2.3</b> Classificação dos surfactantes em diferentes classes.....	15
<b>TABELA 4.4</b> Parâmetros instrumentais recomendados pelo fabricante para determinação de As por GF AAS.....	34
<b>TABELA 4.5</b> Programa de temperatura utilizado para o tratamento dos tubos de grafite e da plataforma interna com os modificadores permanentes.....	37
<b>TABELA 4.6</b> Matriz do planejamento fatorial $2^3$ completo para o programa de temperatura.....	41
<b>TABELA 4.7</b> Matriz do planejamento composto $2^2$ com ponto central para otimização multivariada das temperaturas de pirólise e atomização.....	42
<b>TABELA 4.8</b> Matriz do planejamento fatorial $2^4$ completo para o sistema As(V)-CPE-GF AAS.....	44
<b>TABELA 4.9</b> Matriz do planejamento composto $2^3$ com ponto central para otimização multivariada do sistema As(V)-CPE-GF AAS.....	45
<b>TABELA 4.10</b> Níveis e fatores utilizados para avaliação dos íons concomitantes selecionados para composição do planejamento fatorial fracionário.....	46
<b>TABELA 5.11</b> Resultados do planejamento fatorial $2^3$ completo para o programa de temperatura.....	52
<b>TABELA 5.12</b> Resultados do planejamento composto central para otimização das temperaturas de pirólise e atomização.....	54
<b>TABELA 5.13</b> Programa de temperatura otimizado para determinação de As(V) por GF AAS após extração por ponto nuvem, utilizando irídio como modificador permanente.....	55
<b>TABELA 5.14</b> Resultados do planejamento fatorial $2^4$ completo para extração de As(V) por ponto nuvem.....	60
<b>TABELA 5.15</b> Resultados do planejamento composto $2^3$ com ponto central para otimização da extração de As(V) por ponto nuvem.....	63
<b>TABELA 5.16</b> Condições otimizadas na extração de As(V) por ponto nuvem.....	66

<b>TABELA 5.17</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ de resolução IV para o estudo de interferentes.....	67
<b>TABELA 5.18</b> Figuras de mérito obtidas para o método As(V)-CPE-GF AAS otimizado.....	73
<b>TABELA 5.19</b> Resultado dos testes de adição e recuperação de As(V) na especificação de arsênio total nas amostras de arroz.....	76
<b>TABELA 5.20</b> Comparação do método proposto neste trabalho com os outros métodos aplicados para extração de arsênio e determinação de As.....	77

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. ARSÊNIO.....	5
2.2. ARROZ.....	9
2.3. ESPECIAÇÃO QUÍMICA E O PREPARO DE AMOSTRAS.....	13
2.4. EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	15
2.5. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE .....	20
2.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO.....	25
2.7. O MÉTODO DO AZUL DE MOLIBDATO PARA EXTRAÇÃO SELETIVA DE As(V).....	30
<b>3 – OBJETIVO.....</b>	<b>33</b>
<b>4 - PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
4.1 – EQUIPAMENTOS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS.....	34
4.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES.....	35
4.3 - MODIFICAÇÃO DOS TUBOS DE GRAFITE.....	36
4.4 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	38
4.5 - OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA.....	40
4.5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA.....	40
4.5.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	43
4.5.2.1 ESTUDO DO EFEITO DO pH.....	43
4.5.2.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO .....	43
4.6 - TESTE DE INTERFERENTES.....	45
4.7 - ESTUDO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO.....	46
4.8 - FIGURAS DE MÉRITO.....	47
4.9 – PREPARO DAS AMOSTRAS.....	47
4.10 - PROCEDIMENTO DE ESPECIAÇÃO DE As INORGÂNICO.....	48
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>50</b>
5.1 – ESTUDO DOS MODIFICADORES E OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA.....	50

5.2 – OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ- CONCENTRAÇÃO.....	56
5.2.1 . ESTUDO DO EFEITO DO pH.....	56
5.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	58
5.3 - ESTUDO DE INTERFERENTES.....	66
5.4 - ESTUDO DA SELETIVIDADE DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM PARA ESPECIAÇÃO DE As.....	69
5.5 - FIGURAS DE MÉRITO.....	71
5.6 – EXATIDÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS REAIS.....	74
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos de interesse alimentício tem recebido atenção especial devido a sua importância na nutrição e saúde humana. Neste sentido, a determinação de micro nutrientes que fazem parte da composição dessa classe de produtos, como metais presentes em níveis traço, tem se tornado um importante campo na análise e na certificação da qualidade de alimentos, uma vez que o papel que estes exercem sobre a funcionalidade fisiológica traça uma delimitação entre a essencialidade e a toxicidade dessas substâncias. [1]

A determinação dos níveis totais de elementos com potencial tóxico, como por exemplo, arsênio, cádmio, níquel e chumbo em alimentos passíveis de incorporação como o arroz, batata, mandioca dentre outros, permite avaliar a possibilidade de impacto ambiental aos seres humanos devido à presença de tais contaminantes nos solos onde foram cultivados ou na água utilizada para irrigação dessas culturas. É importante ressaltar que há diferenças nas formas de absorção, metabolismo e excreção entre diferentes espécies orgânicas e inorgânicas por organismos vivos.

A evolução dos métodos de determinação de substâncias, bem como sua aplicação em diversos estudos, permite um entendimento maior sobre a atuação dos elementos tóxicos no organismo. Sendo assim, a fixação de níveis seguros para essas espécies nos mais variados materiais revela a sua importância, justificando a necessidade de linhas de pesquisas nessa orientação.

Estipular dosagens seguras não necessariamente torna-se suficiente, mas a sua constante revisão também é relevante, visto que vários contaminantes apresentam diferentes efeitos em curto e em longo prazo, o que torna a avaliação da toxicidade de um composto ou elemento algo relativo. De um passado não muito distante é possível encontrar relatos sobre o uso de diversos compostos como cosméticos, aditivos alimentares e fármacos, que atualmente têm reconhecida toxicidade, o que permite deduzir que no futuro, outras substâncias hoje empregadas recebam uma limitação em seu uso. [2]

Dentre as técnicas empregadas na análise de contaminantes em alimentos, há um destaque para aquelas voltadas para identificação e quantificação de compostos orgânicos, principalmente provenientes de pesticidas, constituintes nutricionais ou funcionais, substâncias obtidas em processamentos ou em preparações, aplicações medicinais, dentre outros. Já constituintes inorgânicos recebem atenção pelo fato de

serem alguns essenciais, enquanto outros são altamente tóxicos. Vale ressaltar que alguns, mesmo participantes no metabolismo de seres vivos, apresentam toxicidade a partir de certo nível, como é o caso do ferro, cromo, cobalto, manganês, vanádio, zinco, cobre e selênio, dentre outros definidos como micronutrientes.

Diante deste contexto, a Química Analítica exerce um papel crucial no desenvolvimento de metodologias eficazes para determinação de substâncias presentes em níveis de concentração muito baixo em variados tipos de matrizes, principalmente aquelas de maior grau de complexidade. Os métodos de preparo de amostras, bem como as técnicas de separação e pré-concentração constituem-se etapas importantes na aplicação de um método analítico para essa finalidade. [3]

Para que a quantificação de substâncias elementares, como as de espécies metálicas, se enquadre dentro dos parâmetros de normatização definidos por agências regulamentadoras, tem-se disponível todo um ferramental analítico instrumental onde as técnicas de espectrometria atômica são de longe as mais empregadas, por apresentar boa seletividade e relativa simplicidade quando comparadas a outras técnicas analíticas.

Em particular, a espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS) tem sido mais aplicada para determinação de elementos inorgânicos em uma variedade de amostras. Uma das dificuldades encontradas no emprego desta técnica é que o analito frequentemente está presente em matrizes complexas além de estar em concentrações abaixo do limite de detecção alcançado pelo equipamento, impedindo que seja determinado diretamente. [4] Isso ocorre principalmente pela baixa eficiência no processo de nebulização da amostra, em que apenas 5 a 10% do seu volume atinge a chama, e também pelo curto tempo de residência do analito no meio atomizador. [5]

Para o objetivo em questão, são requeridas técnicas analíticas altamente sensíveis. A espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massa atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) tem sido recomendadas para essa proposta. Apesar dessas técnicas apresentarem excelente sensibilidade, apresentam custos bastante elevados para a maioria dos pesquisadores por serem dispendiosas, gerarem bastante gastos para aquisição e manutenção.

A espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) e espectroscopia de absorção atômica eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) são técnicas que apresentam sensibilidade satisfatória para serem empregadas na análise de traços ou até mesmo ultra-traço em casos de tratamento prévio, e são bem mais

acessíveis aos laboratórios. Tais técnicas conseguem alcançar limites de detecção compatíveis com a sensibilidade requerida para determinar elementos em diversos tipos de amostras. No entanto, a técnica com geração de hidretos requer uma etapa de digestão e um volume relativamente maior de amostra, enquanto a técnica do forno de grafite permite a eliminação da matriz no próprio equipamento (*in loco*), caracterizando-o como um digestor sequencial, dispensando assim um processo mais drástico na abertura de algumas amostras, sendo necessária apenas a otimização de alguns parâmetros. Outra importante vantagem do forno de grafite é a pequena quantidade de amostra utilizada, que se enquadra dentro da faixa de microlitros. [6]

Apesar do grande avanço das técnicas existentes, a interferência de matrizes complexas ainda continua sendo um problema em análises quantitativas. Para contornar e minimizar esses efeitos, vários estudos enfocando a separação e pré-concentração do analito tem sido desenvolvidos. Dentre os principais métodos reportados na literatura, podem ser citados a extração por fase sólida, extração líquido-líquido convencional e não convencional, co-precipitação, troca iônica e a extração por ponto nuvem. Tais métodos tem a vantagem de proporcionar um aumento adicional na sensibilidade pelo fato de enriquecer o analito numa fase de volume bem menor, baseado na transferência de massa do elemento oriundo de uma outra fase de maior volume.

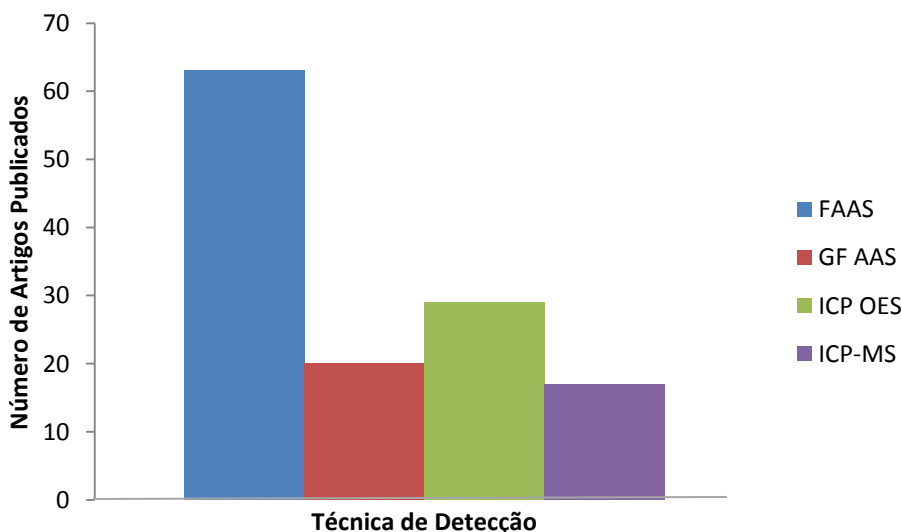
A extração por ponto nuvem (CPE) vem se destacando como uma técnica alternativa bastante versátil e promissora na separação e pré-concentração de várias substâncias. No que diz respeito ao desenvolvimento de novos métodos que vem de encontro com os princípios da “Química Verde”, a CPE visa a implantação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso de reagentes nocivos à saúde humana e a geração de resíduos prejudiciais ao meio ambiente. [7] Trata-se de uma vantagem preponderante, que tem promovido o atual conceito de Química Limpa nos institutos de pesquisa, universidades e indústrias.

A extração por ponto nuvem tem se tornado uma alternativa eficiente em relação aos demais métodos convencionais de extração citados anteriormente por apresentar altos fatores de pré-concentração, simplicidade de operação, segurança em razão da baixa inflamabilidade do uso de surfactante, baixa toxicidade para o analista e para o ambiente. Portanto, a CPE pode-se ser facilmente aplicada como uma técnica de rotina nos laboratórios devida a sua fácil acessibilidade.

Outra grande vantagem do emprego da extração por ponto nuvem, é que ela se mostra compatível com as técnicas de detecção espectroscópicas aqui citadas. Isso pode

ser observado segundo a revisão bibliográfica realizada por DEPOI, sobre o número de publicações envolvendo tais técnicas como meio de detecção. Os dados foram colhidos através de um levantamento realizado na base de dados “Web of Science” em março de 2012. A pesquisa compreendeu as publicações obtidas entre os anos de 1982 e 2012. [8]

De acordo com a FIGURA 1.1, vê-se uma distribuição mais voltada para a aplicação do FAAS, devido a uma maior facilidade de uso rotineiro e o menor custo da técnica. O emprego do GF AAS também se mostra usual, entretanto em comparação com o FAAS, o GF AAS não é tão comumente empregado nessa finalidade por às vezes já suprir as limitações de sensibilidade requerida em muitas análises. O GF AAS também se mostra compatível para ser empregado no sistema de ponto nuvem, conseguindo aprimorar ainda mais os limites de detecção durante a validação do método.



**FIGURA 1.1** Publicações de artigos entre 1982 e 2012 relacionando o uso da extração por ponto nuvem e a determinação mediante técnicas de espectroscopia atômica. (Extraído de Fernanda Depoi – Tese de Doutorado, 2012)

Neste trabalho, a técnica de extração por ponto nuvem foi utilizada no intuito de pré-concentrar e também discriminar espécies de arsênio inorgânico em amostras de arroz providas de vários beneficiamentos. Uma vez que o arroz é um elemento essencial para grande parte da população brasileira e mundial, sendo o Brasil o maior produtor não asiático, o consumo interno atinge aproximadamente 26,5 Kg de arroz/habitante/ano (IBGE, 2010). Além disso, estudos relatam elevadas concentrações de arsênio em arroz cultivado em solos irrigados com água contaminada, [9] surgindo daí a necessidade de investigação nos cultivos regionais de arroz.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ARSÊNIO

O arsênio é um semi-metal de massa atômica 75, tóxico, carcinogênico e com ampla distribuição na biosfera. Os oceanos possuem uma concentração média desse elemento de 2,0 a 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto a crosta terrestre apresenta uma média de 2,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . [10] Na crosta terrestre, o arsênio compreende cerca de 0,00005% de sua composição distribuídos em diversos minérios, como As mineral (em seu estado elementar), arsenopirita (FeAs), arsenolita ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) e nicolita (NiAs).

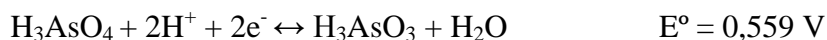
É possível encontrar também espécies metiladas de arsênio, que são produzidas como metabólitos em vários organismos devido à presença de bactérias (como *E. coli*, *Flavobacterium sp*, *Methanobacterium sp*) e fungos (como *Aspergillus glaucus*) que apresentam a capacidade de biometilar arsênio. [11] Também a flora e a fauna marinha contêm compostos derivados do arsênio, pois nas vias metabólicas o nitrogênio e o fósforo podem ser facilmente trocados por ele. Tais compostos incluem a arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC) e arseno-açúcares de origem algal. [12]

Compostos contendo arsênio são utilizados em algumas aplicações industriais, como na manufatura de certos vidros, em formulações farmacêuticas, na preservação da madeira, em materiais semi e fotocondutores, dentre outros. Na agricultura, o arsênio é muitas vezes encontrado na composição química dos princípios ativos de defensivos e insumos agrícolas, tais como herbicidas, inseticidas, desfolhantes e fertilizantes. [13]

O arsênio inorgânico compreende as espécies trivalente As(III) e pentavalente As(V), dos quais são prontamente solúveis em água e altamente tóxicas, sendo uma das poucas substâncias que tem sido causador de câncer em humanos por consumo de água e alimentos contaminados, além de serem bioacumulativas. A longa exposição a compostos inorgânicos de arsênio pode provocar envenenamento crônico, levando ao desenvolvimento de uma doença conhecida como arsenicose. Os efeitos da doença, que podem ser manifestados ao longo dos anos dependem do nível de exposição e são caracterizados por apresentar lesões na pele (hiperqueratose e hiperpigmentação) afetando a atividade celular por inibição enzimática, levando ao surgimento de câncer bem como doenças cardiovasculares e gangrena nos membros. [14] Compostos orgânicos de arsênio, dos quais são abundantes em alimentos de origem marinha são bem menos prejudiciais a saúde e estes são rapidamente eliminados pelo organismo.



Levando em consideração as espécies inorgânicas, a razão As(III) / As(V) em águas naturais oxigenadas é de 1:10<sup>26</sup> de acordo com a equação de Nernst (Eq. 1), porém essa proporção varia entre 10:1 e 1:10, devido a ação de microorganismos presentes na água. [16]



$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4][\text{H}^+]^2}$$

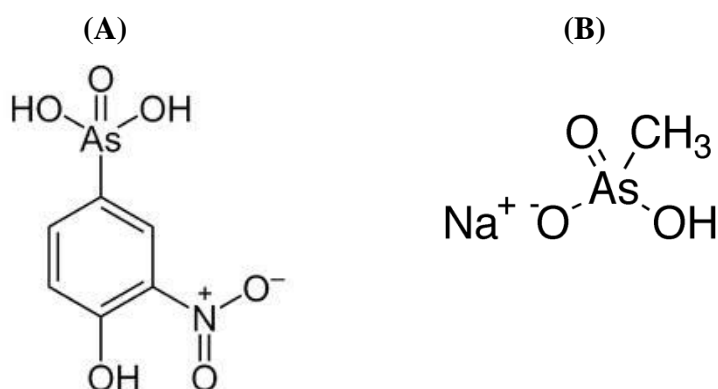
$$E = 0,0559 - 0,0296 \left( \log \frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4]} + 2\text{pH} \right)$$

$$\frac{[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{H}_3\text{AsO}_4]} = 10^{\left( \frac{0,0559 - E - 0,0592\text{pH}}{0,0296} \right)} \quad \text{(Eq. 1)}$$

A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênio, segundo ANDERSON et. al., é a seguinte: arsina > arsenito > arsenato > ácidos alquil-arsênicos > compostos de arsênio > arsênio elementar. O arsênio trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente (arseniato). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA). [15,17]

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), em um estudo conduzido juntamente com o “Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)” em 2010, foi determinado o valor de 3,0 µg de arsênio inorgânico absorvido por dia para cada quilo em peso corporal (2 – 7 µg kg<sup>-1</sup> por dia baseado na variedade de exposição total através da dieta). Este valor foi definido como limite inferior da dosagem para constatar aumento de 0,5% da incidência de câncer de pulmão (BMDL<sub>0,5</sub>), através de dados epidemiológicos. O Comitê constatou ainda que a quantidade tolerada de arsênio inorgânico anteriormente estabelecida de forma provisória, que era de 15 µg kg em massa corporal, foi nas regiões de BMDL<sub>0,5</sub> e portanto não estava apropriado. Logo esse valor pré-estabelecido foi retirado pelo comitê e nenhum novo valor, que especificasse o nível tolerado de arsênio inorgânico foi estabelecido. [15]

Essa preocupação está intimamente ligada ao uso de aditivos alimentares como parte de estratégias nutricionais. Eventualmente, se emprega um estimulante organoarsênico denominado Roxarsone<sup>®</sup> (FIGURA 2.2 A) na alimentação das aves visando garantir uma melhor pigmentação da carne, promover uma aceleração do crescimento, aumentar o peso das aves e eliminar os parasitas causadores de doenças. Esse composto pode ser facilmente convertido nas formas mais tóxicas desse elemento, que são as formas inorgânicas As(III) e As(V). Trabalhos na literatura mostram que um microorganismo do gênero *Clostridium* é capaz de converter em menos de 10 dias o Roxarsone<sup>®</sup> em arsenato. [18] No Brasil, o herbicida organoarsenical metanoarsenato monossódico (MSMA), conhecido comercialmente como Daconate<sup>®</sup> (FIGURA 2.2 B), de curta persistência é autorizado para aplicação nas culturas de ervas daninhas de café, algodão, cana-de-açúcar e cítricos. [19]



**FIGURA 2.2** (A) Estrutura química do aditivo Roxarsone<sup>®</sup> (ácido 3-nitro-4-hidróxifenilarsênico); (B) Estrutura química do aditivo Daconate<sup>®</sup> (MSMA).

Como a biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos e toxicológicos do arsênio dependem de sua forma química, o conhecimento da especiação e transformação no meio ambiente torna-se muito importante, necessitando de métodos adequados para a separação e determinação das espécies de arsênio. [20]

## 2.2. ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. A produção anual de arroz é de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com 13.140.900 toneladas (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não asiático entre os 10 maiores produtores. [21]

A estrutura do grão de arroz consiste da cariopse (farelo) e de uma camada protetora, a casca. A casca, composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, corresponde a cerca de 20% do peso do grão. A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam 5-8% da massa do arroz integral. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos proteicos) e os corpos lipídicos. O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídios, e representa 2-3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94% do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos proteicos.

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento, produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas. Além disso, os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. [22,23]

O grão de arroz, antes de estar na forma adequada para ser adquirido pelo consumidor, é submetido por processos de beneficiamento. As três principais formas em que o arroz beneficiado é consumido, em ordem de importância são: o arroz branco, o arroz integral e o arroz parboilizado.

O beneficiamento tem início com a separação da casca do restante do grão. Nesta etapa obtém-se o arroz integral sem sofrer nenhum processo de polimento, ou seja, somente a retirada da parte que recobre o grão que vai do pericarpo até a aleurona, conhecido como farelo de arroz. O arroz polido sofre esse processo de limpeza, sendo

essa referida camada retirada. Já o arroz parboilizado, termo adaptado do inglês “partial partial boiled”, é o arroz parcialmente cozido com a casca. Neste processo, o grão absorve nutrientes da casca como elementos químicos e vitaminas. Assim, o arroz pode ser parboilizado e depois descascado somente, fornecendo o arroz integral ou descascado e posteriormente polido fornecendo o arroz branco ou polido. [24]

Tendo em vista a importância do arroz na cultura e alimentação da população, variações na composição química, das quais se destacam aquelas resultantes do genótipo e do beneficiamento, podem contribuir para as dietas de maneira diferenciada. Quanto à influência do processamento, há relatos de diferenças expressivas nos teores de gordura, fibra alimentar e minerais entre o arroz branco e o integral. Já o processo de parboilização, influencia significativamente os teores de minerais e amido digestível. Com isso, dependendo do processamento ao qual o grão de arroz for submetido, a composição química pode ser modificada, e assim influenciar na composição da dieta. [25]

A concentração de minerais difere nas frações do grão. Enquanto no arroz com casca o silício é o componente dominante, no arroz integral e polido, destacam-se fósforo, potássio e magnésio. Ferro e zinco, dois minerais essenciais para a saúde humana, estão disponíveis em baixas concentrações no grão. Devido à importância do arroz na alimentação, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para aumentar a concentração de minerais no grão, principalmente desses elementos. Uma das formas utilizadas é o melhoramento convencional, a partir de genótipos com maior concentração destes minerais, visto que existe grande variação na concentração de ferro ( $2-52 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e zinco ( $6-28 \mu\text{g g}^{-1}$ ) entre genótipos. A transgenia também vem sendo utilizada com esse objetivo.

O conteúdo mineral é fortemente influenciado pelas condições de cultivo, incluindo fertilização, condições do solo e pelo processamento. De forma geral, os minerais apresentam-se em maior concentração nas camadas externas do grão (TABELA 2.1), com aproximadamente 72% no farelo e 28% no grão polido. Entretanto, alguns minerais apresentam distribuição mais uniforme, como sódio e cálcio, permanecendo no arroz branco polido 63% do sódio e 74% do cálcio do arroz integral. Embora o arroz integral tenha maior concentração de minerais do que o polido, isso não significa necessariamente maior quantidade de minerais absorvidos pelo organismo, visto que a biodisponibilidade pode ser afetada pela presença de maiores teores de fibra e ácido fítico no arroz integral. [26,27]

**TABELA 2.1** Teor de minerais encontrados na composição química em arroz integral e branco polido.

Mineral	Arroz Integral	Arroz Branco Polido
Macrominerais ( $\text{mg g}^{-1}$ , com 14% de umidade)		
Cálcio	0,1 – 0,5	0,1 – 0,3
Magnésio	0,2 – 1,5	0,2 – 0,5
Fósforo	1,7 – 4,3	0,8 – 1,5
Potássio	0,6 – 2,8	0,7 – 1,3
Silício	0,6 – 1,4	0,1 – 0,4
Enxofre	0,3 – 1,9	0,8
Microminerais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , com 14% de umidade)		
Alumínio	0,3 – 26,0	0,1 – 2,2
Cádmio	0,02 – 0,16	0,025
Cloro	210 - 560	200 – 300
Cobalto	0,03 – 0,04	0,017
Cobre	1 - 6	2 – 3
Iodo	0,03	0,02
Ferro	2 - 52	2 – 28
Manganês	2 - 36	6 – 17
Níquel	0,2 – 0,5	0,14
Selênio	0,3	0,3
Sódio	17 - 340	5 -86
Zinco	6 - 28	6 - 23

Adaptado de JULIANO (1985). [27]

O arroz, diferente dos outros cereias é cultivado geralmente em solos inundados, onde condições anaeróbicas somadas ao excesso de água levam a mobilização do arsênio e, conseqüentemente ao aumento do acúmulo da planta. Vários estudos relatam elevadas concentrações de arsênio em arroz cultivado em solos irrigados com águas contaminadas. [28–32] O As(III), espécie mais tóxica, tem alta solubilidade e mobilidade no solo, sendo eficientemente absorvido pelas raízes, chegando aos grãos e sendo incorporada na cadeia alimentar. Por esses motivos a presença de arsênio em amostras de arroz vem sendo avaliada em vários países. Porém, no Brasil, um país onde este alimento é muito consumido, há pouca informação sobre a concentração total de arsênio e sobre suas espécies. [33]

No Brasil, as legislações vigentes que estabelecem os limites máximos de tolerância para arsênio em alimentos são a Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; decreto nº 55871 de 26 de

março de 1965. Os limites estabelecidos por essa portaria estão indicados na TABELA 2.2 e, para todos os outros alimentos que não foram citados nesta portaria, é adotado como limite máximo o valor de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de acordo com o referido decreto.

**TABELA 2.2** Limite máximo de tolerância para arsênio em alimentos.

<b>Alimentos</b>	<b>Limite máximo de Arsênio (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
Gordura vegetais e emulsões	0,1
Gorduras hidrogenadas	0,1
Açúcares caramelos e balas	1,0
Bebidas alcólicas fermentadas e fermento-destiladas	0,1
Cereais e produtos de cereais	1,0
Gelados comestíveis	1,0
Ovos e produto de ovos	1,0
Leite e fluídos pronto para o consumo	0,1
Mel	1,0
Peixes e produtos de peixe	1,0
Chá, mate e derivados	1,0
Demais alimentos	1,0

Fonte: Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde; Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965.

### 2.3. ESPECIAÇÃO QUÍMICA E O PREPARO DE AMOSTRAS

Antigamente, a determinação da concentração total de um dado elemento parecia ser suficiente para todas as considerações clínicas e ambientais. Hoje já não é mais assim. Embora se tenha o conhecimento oficial da concentração total de um dado elemento, é essencial em muitos esquemas analíticos a determinação das espécies químicas na qual o elemento está distribuído. [34]

Sabe-se atualmente, que a determinação da concentração total de um elemento é uma informação limitada, especialmente no que diz respeito sobre o seu comportamento no meio ambiente e aos danos que pode causar à saúde. As propriedades físicas, químicas, biológicas e toxicológicas são dependentes da forma química em que o elemento está presente. Por exemplo: a medida da concentração total de arsênio não indica se os verdadeiros níveis de cada espécie individualmente. Para estimar o risco envolvido, é preciso levar em consideração a variação na toxicidade, o transporte e a biodisponibilidade, que são dependentes das formas químicas na qual o arsênio está presente. Por isso, a necessidade de métodos analíticos que ajudem a diferenciar essas formas.

Diferentes técnicas de separação e detecção podem ser utilizadas para estudos de especiação. No entanto, a grande maioria destas técnicas é limitada, pois não tendem a combinar uma capacidade de separação eficiente, a seletividade e a sensibilidade requerida para a detecção. Para essa finalidade, os métodos de especiação são classificados em cromatográficos e não-cromatográficos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica eficiente para separação de várias espécies químicas, no entanto os detectores utilizados na HPLC não são versáteis e sensíveis o suficiente para serem aplicados na determinação de baixas concentrações. Sinais atômicos distintos obtidos por meio das técnicas de espectroscopia atômica são difíceis de serem obtidos em função das formas químicas, no entanto é possível utilizar as técnicas espectroatômicas hífenadas entre alguns processos de separação e pré-concentração. [35,36]

Um passo fundamental para se obter resultados com maior confiabilidade em uma análise de especiação é manter a integridade das espécies químicas durante o pré-tratamento das amostras. O preparo de amostras sólidas visando a especiação de arsênio, geralmente inclui procedimentos como trituração, liofilização, moagem, tamisação e extração. Para que um método de extração seja considerado ideal, é desejável a extração

quantitativa das espécies de arsênio sem conversão e que os solventes utilizados não interfiram na análise. Muitos métodos clássicos de digestão, submetem as amostras a um ataque ácido com a ação combinada de uma fonte de energia, podendo esta ser térmica por meio de aquecimento convencional ou através de um bloco digestor, ou também por meio de procedimentos mais desenvolvidos como emprego de radiação micro-ondas ou por meio da extração assistida por ultra-som. [9]

A extração assistida por ultra-som tem sido aplicada com sucesso para extrações totais e parciais de amostras sólidas em fases líquidas. Isso simplifica o preparo das amostras aumentando a taxa de extração, evitando a contaminação das amostras e prevenindo a perda dos analitos.

A extração por ultra-som se baseia na remoção dos elementos químicos de materiais sólidos e transferência para um solvente apropriado. Após passar através do meio líquido, a energia ultrassônica promove o fenômeno de cavitação, que é a produção de microbolhas devido a mudanças rápidas na pressão do líquido. Durante esse processo, as bolhas implodem, ocasionando a formação de radicais e energia térmica que aceleram os efeitos físicos na solução, propiciando uma maior superfície de contato com o meio extrator, o que pode levar a recuperações significativas. Devido a essas vantagens, o emprego da extração assistida por ultra-som tem sido proposta como uma alternativa simples e de baixo custo para acelerar a extração de diferentes elementos químicos de amostras biológicas, ambientais e alimentícias. [37,38]

## 2.4. EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

A extração por ponto nuvem (CPE) é uma técnica que se baseia no fenômeno em que uma solução aquosa de um surfactante torna-se turva por adição de uma substância apropriada ou por alteração de algumas de suas propriedades, tais como a temperatura, a força iônica do meio ou a pressão. O surgimento da turbidez ocorre porque o surfactante atinge o seu ponto nuvem. Neste ponto, a solução original separa-se em duas fases isotrópicas distintas: uma rica em surfactante e de pequeno volume, contendo o analito orgânico ou inorgânico desejado, e uma outra fase que provém da solução matriz (denominada fase pobre ou fase aquosa) de grande volume, com a concentração do surfactante próxima a sua concentração micelar crítica, que deve ser descartada. [7]

A extração por ponto nuvem vem se desenvolvendo e se aperfeiçoando muito nos últimos anos, permitindo a separação e a determinação de uma variedade de espécies químicas em diferentes matrizes. A extração por ponto nuvem foi registrada na literatura pela primeira vez por WATANABE e TANAKA (1978) para pré-concentração de quelatos metálicos empregando PONPE 7,5 como surfactante. [39] Desde então, o uso da CPE em processos de extração de metais e substâncias orgânicas em amostras biológicas, clínicas e ambientais tornou-se um campo propício para desenvolvimento de novos métodos.

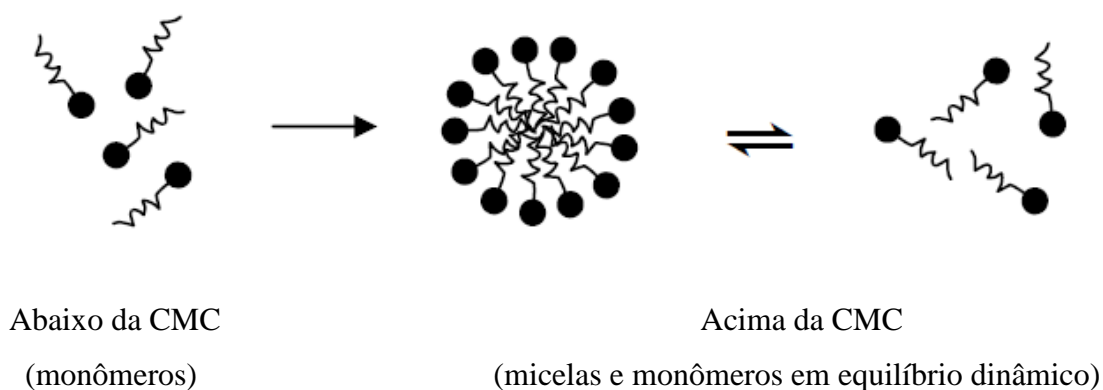
Estruturalmente, os surfactante ou tensoativos são substâncias orgânicas anfipáticas que apresentam uma longa cadeia hidrofóbica e um pequeno grupo carregado ou polar hidrofílico. A classificação dos surfactantes é baseada na sua natureza, sendo assim os surfactantes podem pertencer a uma das quatro categorias seguintes: não iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros, conforme mostra a TABELA 2.3. A combinação de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única molécula confere aos surfactantes propriedades únicas de dissolução em água e outros solventes.

**TABELA 2.3** Classificação dos surfactantes em diferentes classes.

<b>Classificação</b>	<b>Surfactante</b>
Não-iônicos	Octilfenoxipolietoxietano (Triton X-114)
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
Aniônicos	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)
Anfóteros	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)

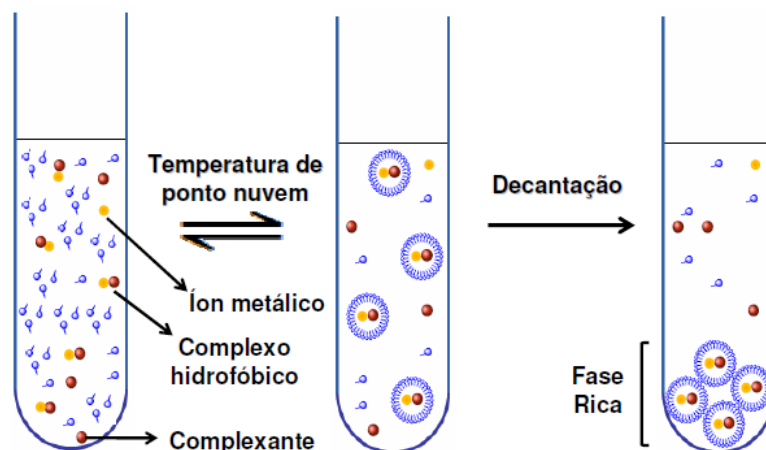
Dependendo de sua estrutura química e da natureza do meio, os surfactantes podem gerar diferentes ambientes organizados, dentre os quais se podem destacar as micelas normais ou aquosas, as micelas reversas, as microemulsões e as vesículas. [40]

As micelas são estruturas supramoleculares de dimensões coloidais, formadas a partir de moléculas de surfactantes que se agregam espontaneamente em solução aquosa quando estas atingem uma faixa específica de concentração denominada concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros não associados. Porém quando a CMC é ultrapassada, o processo de formação de agregados micelares é favorecido, dentro de uma dinâmica de equilíbrio com seus próprios monômeros, indicando que as micelas não são estruturas estáticas (FIGURA 2.3). As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis, porém elas podem ser destruídas pela diluição com água quando a concentração do surfactante estiver abaixo da CMC.



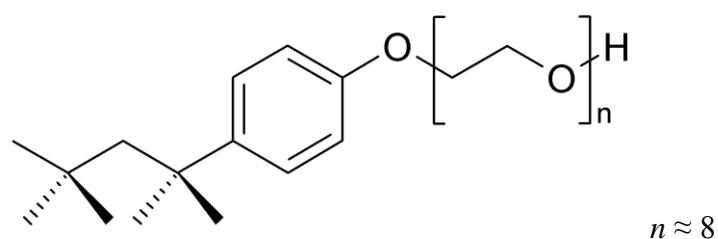
**FIGURA 2.3** Representação esquemática do equilíbrio de formação das micelas.

A aplicação da CPE é relativamente simples: poucos mililitros de uma solução concentrada de surfactante são geralmente adicionados a algumas centenas de mililitros da amostra aquosa. Se o analito a ser pré-concentrado for um metal, uma solução de agente complexante deve ser adicionada para a formação de um quelato hidrofóbico. Se o analito for apolar ou apresentar uma polaridade muito baixa, ele já está apto a ser pré-concentrado. A solução deve ser aquecida em banho termostatizado acima da temperatura de ponto nuvem para que ocorra a separação das fases, e esta deve ser acelerada por centrifugação no caso de fases micelares de surfactantes que tenham densidade maior que a solução da amostra, conforme mostra a FIGURA 2.4.



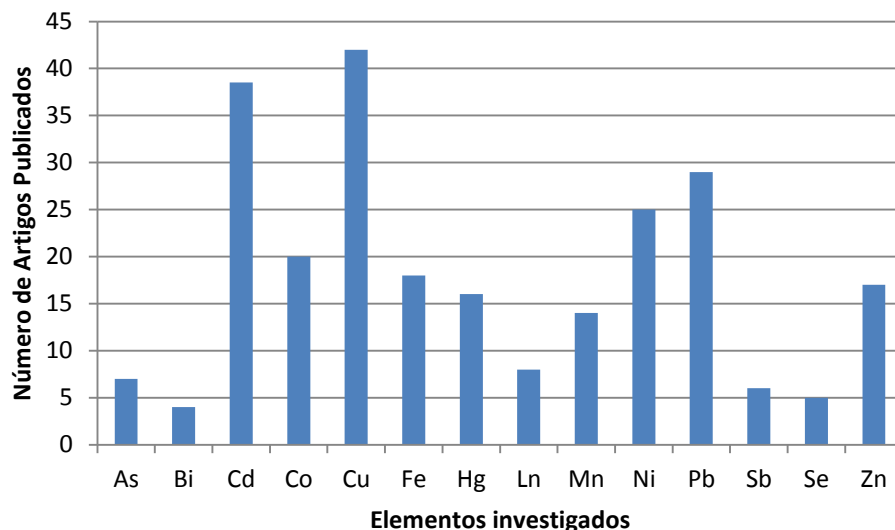
**FIGURA 2.4** Processo de formação do ponto nuvem aplicado na extração e pré-concentração de um íon metálico.

Um surfactante para ser empregado em CPE deve apresentar algumas características desejáveis, tais como baixa temperatura de ponto nuvem e alta densidade, que facilitam a separação das fases. O surfactante não-iônico Triton X-114 (FIGURA 2.5) apresenta essas características, além de ser facilmente disponível em um custo baixo.



**FIGURA 2.5** Estrutura química do surfactante Triton X-114

Fazendo um levantamento bibliográfico com relação à extração de íons metálicos empregando CPE, DEPOI também observou o número de publicações referentes aos elementos As, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Ln, Mn, Ni, Pb, Sb, Se e Zn, dos quais estão relatados na FIGURA 2.7. Os dados apresentados nessa figura foram obtidos através de pesquisa realizada na base de dados “Web of Science” em março de 2012. Como pode ser observado pela FIGURA 2.6, a pré-concentração de Cd, Cu, Pb e Ni foi avaliada em um número significativo de publicações. No entanto, elementos como As, Bi, Hg, Sb e Se ainda são pouco explorados. [8]



**FIGURA 2.6** Publicações de artigos entre 1982 e 2012 relacionados com a pré-concentração dos elementos citados mediante CPE. Ln: Lantanídeos. (Extraído de Fernanda Depoi – Tese de Doutorado, 2012)

FANG et. al. (2001) foram os primeiros pesquisadores a propor a incorporação de um sistema em linha para CPE na extração e pré-concentração de cuproporfirina a partir de amostras de urina e determinação por quimioluminescência. Segundo FANG, para ser possível a realização da CPE totalmente em linha, foram solucionadas três dificuldades: A primeira seria a complexidade de incorporar um sistema de aquecimento dentro de um sistema FIA, o qual foi evitado pelo emprego de um reagente eletrolítico para promover a diminuição da temperatura do ponto nuvem à temperatura ambiente. Segundo, a dificuldade de acelerar a separação da fase micelar da fase aquosa, que nos procedimentos fora de linha é realizado por uma centrífuga, foi resolvido com o acoplamento em linha de uma coluna filtrante inerte (como lã de vidro ou algodão), e terceiro, a determinação espectroscópica de analitos em meio micelar foi realizado pelo emprego de uma reação de quimioluminescência que induz a emissão de luz permitindo uma detecção sensível e seletiva. [41]

Com intuito de realizar especiação de cromo, MATOS et. al. (2009) utilizaram CPE. O procedimento foi baseado na complexação de Cr(III) com PAN 1-(2-piridilazo)-2-naftol, e em seguida foi realizada extração com Triton X-114. A fase rica foi analisada por FAAS e a fase aquosa contendo a espécie Cr(VI) foi novamente submetida ao procedimento de ponto nuvem, com uma etapa prévia da redução do Cr(VI) para Cr(III) utilizando ácido ascórbico. A concentração de Cr total foi calculada pela soma entre a

concentração de Cr(VI) reduzida e Cr(III). O método foi aplicado com sucesso para amostras de efluentes de indústrias de curtume. [42]

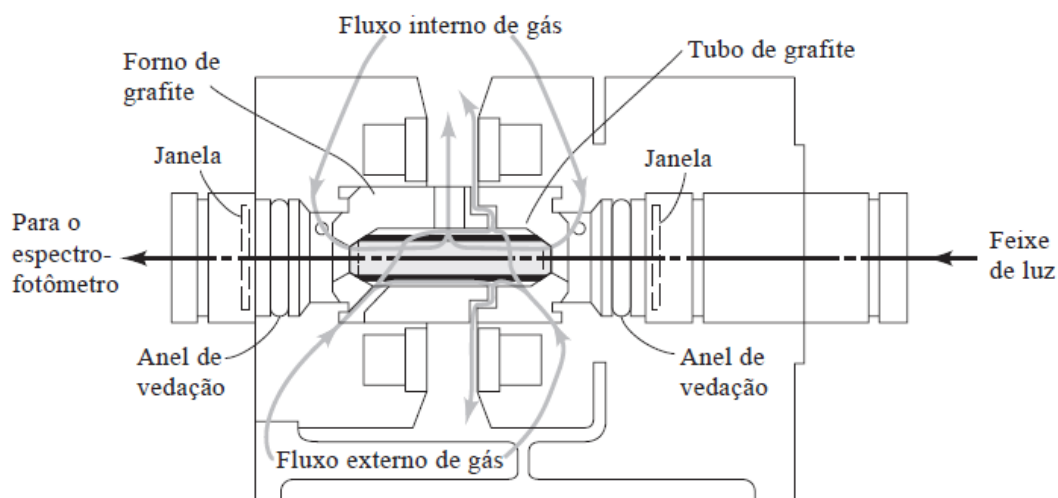
A fim de determinar cádmio em amostras de refrigerantes armazenados em embalagens PET, REZENDE et. al. (2011) empregaram CPE para extrair e pré-concentrar cádmio utilizando PAN como complexante, Triton X-114 como surfactante e NaCl para promover o ponto nuvem em temperatura ambiente. A fase rica foi levada para um sistema de detecção baseado em um forno tubular adaptado sobre o queimador de um FAAS, gerando um aerossol térmico (TS-FF-AAS). O método apresentou um limite de detecção de  $0,0178 \mu\text{g L}^{-1}$  e um fator de pré-concentração de 55,5. [43]

BAIG e colaboradores (2009) empregaram extração por ponto nuvem e extração em fase sólida (SPE) utilizando  $\text{TiO}_2$  como material sorvente, para determinar respectivamente As(III) e arsênio inorgânico total ( $i\text{As}$ ). Os autores desenvolveram um método para especiação de arsênio em amostras de águas naturais e subterrânea, empregando estratégias multivariadas para otimização. As espécies extraídas foram determinadas por ETAAS, conseguindo alcançar os limites de detecção de 0,04 e  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  para  $i\text{As}$  e As(III) respectivamente. [44]

## 2.5. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE

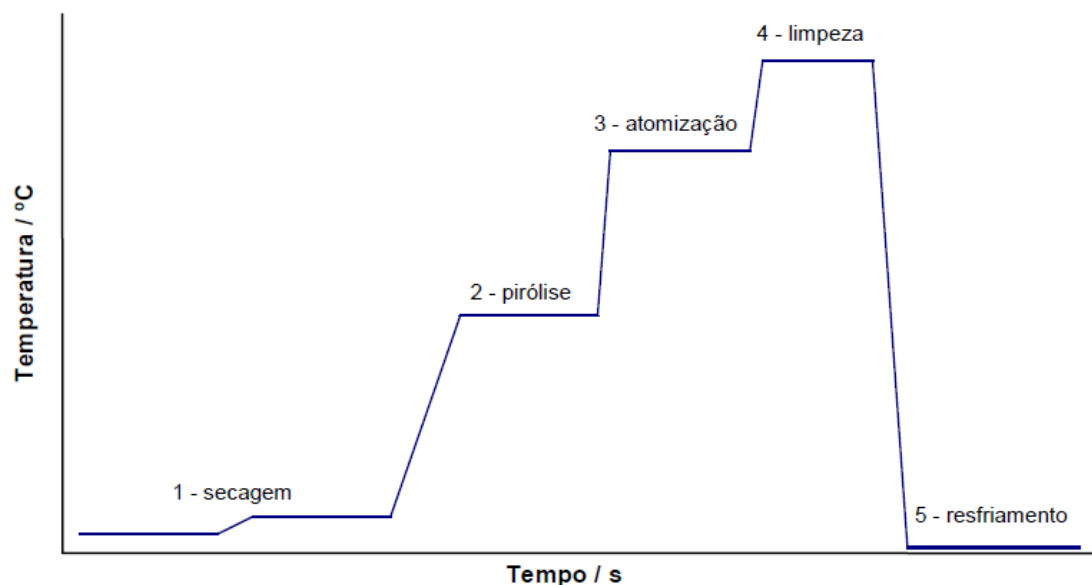
A técnica da Espectrometria de Absorção Atômica baseia-se na absorção da energia radiante pelas espécies atômicas neutras, não-excitadas, em estado gasoso. Cada espécie atômica possui um espectro de absorção formado por uma série de raias estreitas características, devido às transições eletrônicas envolvendo os elétrons externos. Na absorção atômica, o elemento a ser determinado é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa, denominado atomização, através da qual se faz passar o feixe de radiação proveniente de uma fonte apropriada como uma lâmpada de cátodo oco. [45]

As principais técnicas analíticas em espectrometria de absorção atômica são baseadas na atomização em chama (FAAS), nas adaptações realizadas para a geração de hidretos (HG AAS) e na atomização eletrotérmica em forno de grafite ou em filamento de tungstênio (ETAAS). A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS), é uma técnica bem estabelecida para determinações elementares. A sua instrumentação convencional consiste no acoplamento de um tubo cilíndrico oco de grafite no interior do forno, aquecido eletricamente por resistividade. O tubo apresenta dimensões com cerca de 5 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro no qual possui um orifício central onde uma micropipeta ou autostrador injeta a amostra. O tubo de grafite se ajusta aos eletrodos localizados na extremidade do sistema atomizador onde são resfriados à água. Um fluxo de gás interno, geralmente argônio, flui das extremidades para a parte central evitando a entrada do ar e eliminando os vapores gerados pela matriz (FIGURA 2.7).



**FIGURA 2.7** Visão longitudinal do sistema atomizador de um forno de grafite.

Para a determinação de um analito por GFAAS, é necessário estabelecer um programa de temperatura específico, com ciclos de aquecimento que podem levar poucos minutos. Na realização de medidas com essa técnica, é imprescindível otimizar um programa de aquecimento apropriado para controlar o tempo e a temperatura das etapas de secagem, de pirólise e de atomização (FIGURA 2.8). Este programa otimizado permite evaporar o solvente bem como eliminar os constituintes da matriz, antes da atomização do analito, a fim de se reduzirem eventuais interferências. Cada elemento, numa determinada matriz, possui uma temperatura de pirólise e uma de atomização características, o que justifica a necessidade de encontrar tais parâmetros para uma determinada análise. Nem sempre a busca por essas condições ótimas é feita de uma forma sistemática, levando-se em consideração todas as variáveis envolvidas. Muitas vezes, a busca pelas melhores condições faz com que seja mais adequado o emprego de técnicas multivariadas para a construção de um programa ótimo de temperatura. [1]

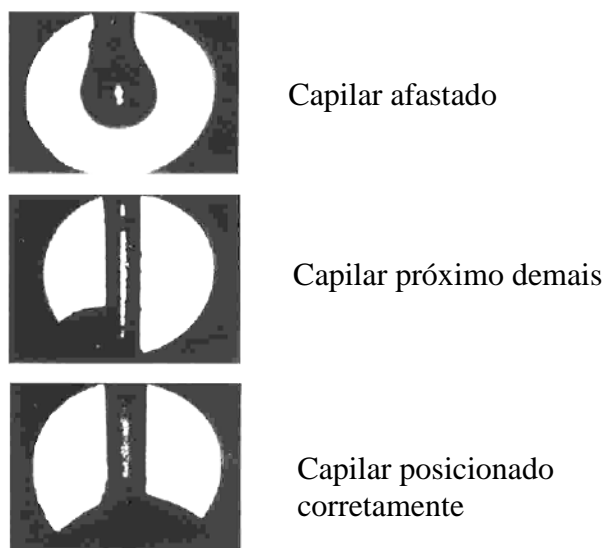


**FIGURA 2.8** Etapas constituintes de um programa de temperatura em GF AAS.

Com a finalidade de obter condições mais reprodutíveis e uma atomização gradativa mais eficiente, geralmente são empregados tubos de grafite integrados com uma plataforma denominada plataforma de L'vov. Esta plataforma fica localizada abaixo do orifício de introdução de amostra. A amostra é evaporada e calcinada sobre essa plataforma, de forma usual. Quando a temperatura do tubo se eleva rapidamente,

contudo, atrasa-se a atomização, uma vez que a amostra não se encontra mais em contato direto com a parede do forno. Em consequência, a atomização ocorre em um ambiente no qual a temperatura não está se alterando tão rapidamente. Como resultado, os sinais mais reprodutíveis são obtidos. Muitos outros modelos de atomizadores eletrotérmicos estão disponíveis comercialmente.

A injeção da amostra no interior do tubo de grafite é uma etapa muito importante, que irá interferir na qualidade dos resultados. Se a posição do capilar que introduz a amostra no interior do tubo de grafite não for a correta, a reprodutibilidade e a sensibilidade obtidas serão comprometidas. A FIGURA 2.9 ilustra a posição correta deste capilar que, caso seja posicionado de forma incorreta, ocasionará uma má distribuição da amostra, além de um aquecimento desigual podendo levar a perda de analito.



**FIGURA 2.9** Posicionamento do capilar do amostrador automático no interior do tubo de grafite, visualização através de um sistema de vídeo incorporado no espectrômetro de absorção atômica.

Infere-se que a principal desvantagem da técnica reside no tempo total gasto quando se deseja determinar muitos elementos por amostra, fazendo com que seja considerada uma técnica de baixa frequência analítica. Entretanto, o GF AAS ocupa uma posição de destaque devido à elevada sensibilidade, seletividade, à pequena quantidade de amostra necessária para realizar a análise e à possibilidade de tratamento térmico da amostra durante o programa de aquecimento, tornando possível introduzir amostras na forma sólida ou por meio de suspensões. A grande quantidade de métodos analíticos bem estabelecidos, a facilidade de operação do equipamento e o alto grau de automação dos espectrômetros modernos também contribuíram para a aceitação da técnica.

O emprego de modificadores químicos é uma prática extremamente comum e muitas vezes necessária nessa técnica. Eles têm como função diminuir, ou até mesmo eliminar, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra, favorecendo um aumento da eficiência da etapa de pirólise, sendo possível empregar temperaturas maiores do que aquelas num processo sem o modificador, bem como proporcionar uma maior estabilidade térmica do analito durante a etapa de atomização. Entretanto, a eliminação dos concomitantes não deve afetar a atomização do analito de interesse. O modificador químico converte o analito em uma forma menos volátil, permitindo maiores temperaturas de pirólise e/ou converte os concomitantes em uma forma mais volátil, promovendo a separação analito-matriz.

Um modificador químico é normalmente uma solução concentrada contendo um ou mais compostos químicos que é adicionada à alíquota da amostra e co-injetada no forno de grafite através do amostrador automático ou diretamente no tubo de grafite pouco antes da introdução da amostra. A solução apresenta uma alta concentração de modo a favorecer as reações entre os concomitantes, o analito e o modificador. São várias as espécies empregadas como modificadores, no entanto uma mistura dos sais nitrato de paládio e nitrato de magnésio é aquela que se destaca como uma das mais usadas em determinações de diversos analitos, sendo por essa razão ser classificada como universal. No entanto, o custo dessa mistura é relativamente alto, principalmente pelo fato dos reagentes usados apresentarem alto grau de pureza, o que favoreceu a busca por outros reagentes.

Como alternativa, surgiu o emprego do modificador permanente, que consiste no revestimento dos tubos de grafite, da plataforma de L'vov integrada e da parede interna, de modo que há um recobrimento parcial de uma área, a partir da deposição de espécies metálicas formadoras de carbetos refratários (W, Zr, Ti, Ta, Nb) ou de metais do grupo da platina (Rh, Ir, Ru, Pd, Pt). [46,47] Em relação à modificação química convencional, a modificação química permanente apresenta as seguintes vantagens: fácil e rápida obtenção da camada de modificador sobre a plataforma ou paredes do forno de grafite; aumenta a velocidade da análise, pois elimina o tempo de secagem do modificador e a etapa de pipetagem do mesmo; não necessita ser um sal de elevada pureza, pois ocorre limpeza *in situ* durante a obtenção da camada, acarretando em um menor custo da análise; atua como catalisador (para halogenetos, ácidos, álcoois e outros sais) em matrizes complexas permitindo a análise de algumas matrizes diretamente sem nenhuma

ou com mínima digestão prévia; Aumenta consideravelmente a vida útil do forno e permite que o GF AAS se transforme em um Digestor Analisador Sequencial. [48]

O uso de modificadores permanentes é um procedimento bastante discutido e relatado em literatura. PEREIRA e colaboradores (2004) testaram vários modificadores permanentes para determinação de Al, Cd, Cr e Pb em água potável. Foram testados tubos tratados com rutênio, irídio, ródio e tungstênio e foi constatado que cada modificador apresenta uma diferente eficiência para cada analito. [49] Num método em que materiais biológicos diversos (cabelo humano, sangue canino, tecidos de peixe e de lagosta) foram digeridos com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e analisados por GF AAS para determinação de cádmio, rutênio foi empregado como modificador permanente. [50] Irídio, ródio, zircônio e rutênio foram usados como modificadores permanentes na determinação de cádmio, cromo e chumbo em sedimentos marinhos e de lagoa, sendo essa amostra introduzida no forno de grafite na forma de suspensão. [51] Um estudo que envolveu a comparação do uso da mistura nitrato de Pd-Mg como modificador químico com o uso de tungstênio, ródio e irídio como modificadores permanentes numa metodologia para determinação de chumbo em *orujo* (aguardente espanhol de uva) usando GF AAS, mostrou uma melhor eficiência dos modificadores permanentes em relação aos demais. [52]

MICHON e colaboradores (2007) desenvolveram um método de rotina para determinação de arsênio em água de consumo por GF AAS, avaliando soluções de Ni, Pd e a mistura Pd-Mg como modificadores químicos convencionais. O método alcançou limite de detecção de  $0,26 \mu\text{g L}^{-1}$ , correspondendo a uma massa característica de 4,2 pg de As. Foi verificada interferência da presença de fosfato e silicato em níveis de mg.L<sup>-1</sup> sobre a determinação. O modificador que apresentou melhores resultados foi a mistura clássica de Pd-Mg utilizando HNO<sub>3</sub> como estabilizante térmico. [53]

AJTONY e colaboradores (2008) desenvolveram um método rápido para determinação simultânea de As, Cd e Cu utilizando em GF AAS multi-elementar por meio de introdução direta de amostras de vinho, alcançando melhores condições com o uso de modificador clássico. [54]

## 2.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem uma resposta de forma mais rápida. Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema. [55]

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, porém, pouco empregada ou explorada em espectrometria atômica. A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo monitorados em um determinado sistema.

Quando é empregada uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas. Na otimização das temperaturas de pirólise e atomização em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), é comum, inicialmente, fixarmos a temperatura de atomização, variando-se somente a temperatura de pirólise. Em seguida, depois de encontrar a melhor temperatura de pirólise, a temperatura de atomização é variada. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer, devido ao fato de que os efeitos de interação entre as variáveis não são explorados. Além do problema relatado anteriormente, o número de experimentos executados é geralmente maior se comparado com aqueles obtidos em um planejamento fatorial. [56]

No planejamento fatorial, inicialmente são executados experimentos de triagem, com o interesse em se determinar as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. É preciso selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, as variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento. [57]

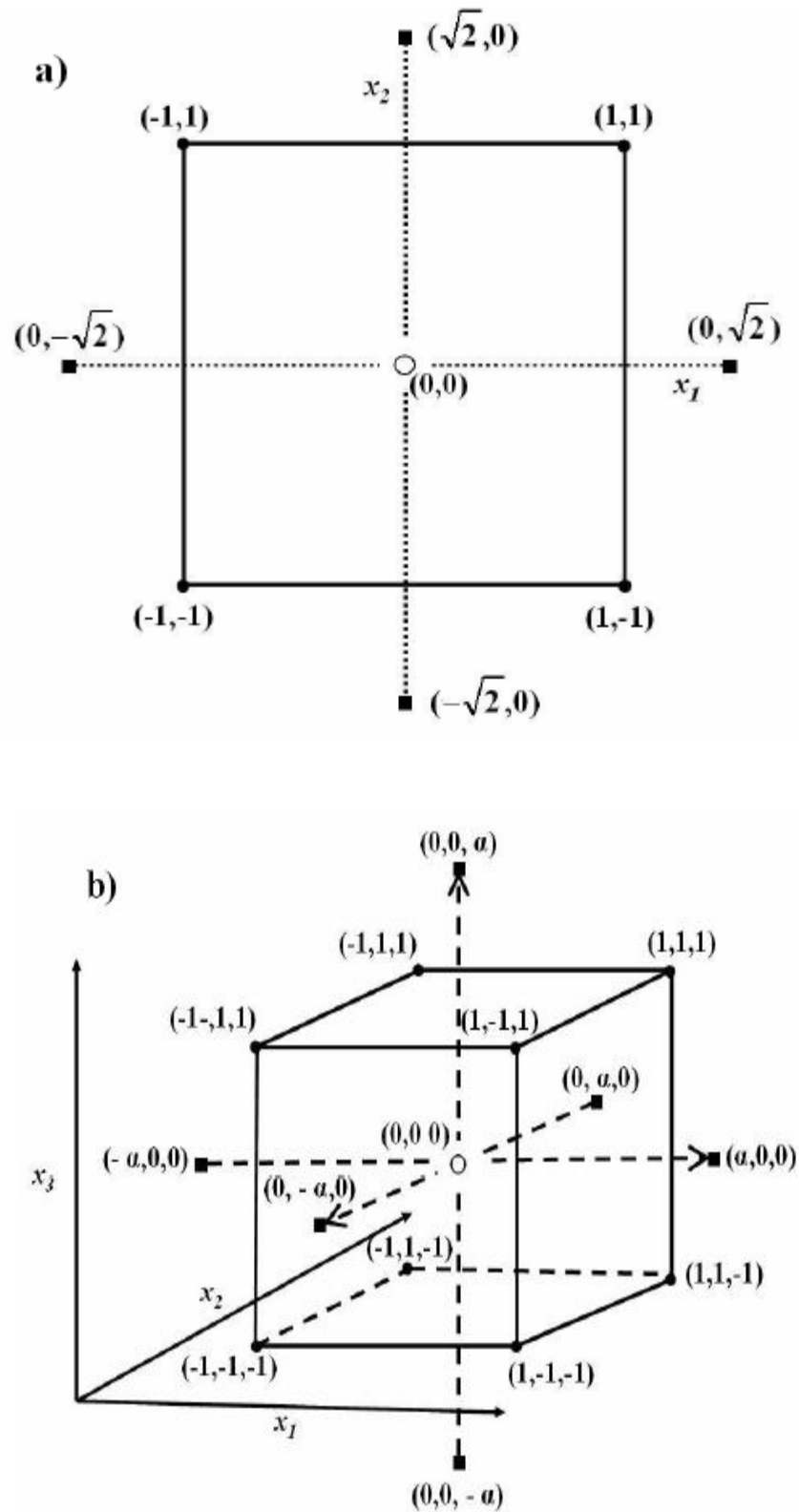
Nesse planejamento, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de  $k$  fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de  $2^k$  experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto.

A indicação dos efeitos dos fatores selecionados, bem como os efeitos de suas interações, são interpretados num gráfico de Pareto, em que as barras horizontais estão associadas com a intensidade do efeito, os valores apontados correspondem aos próprios e o sinal indica qual dos dois níveis tem maior influência na resposta. São significativos com 95% de confiança os efeitos que estão além da linha de corte. De fato, são mais interessantes nesse gráfico quais efeitos primários são significativos e os respectivos níveis que lhes afetaram.

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfície de resposta pode ser executada para otimização do experimento. A metodologia de superfície de resposta (SRM, do inglês “Surface Response Methodology”) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais e abrange um conjunto de procedimentos estatísticos usados na modelagem matemática de resposta. Essa técnica utiliza também planejamentos fatoriais ampliados, de segunda ordem, onde se destacam os modelos Composto Central, Box-Behnken, Matriz de Doehlert, extensamente usados nos últimos tempos.

Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. Os planejamentos composto central (CCD), do inglês “Central Composite Design”, possivelmente são as classes de planejamentos mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos.

Os planejamentos compostos centrais (CCD) foram apresentados por Box e Wilson em 1951 como uma evolução dos planejamentos  $3^3$ , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores. Para construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas ( $J$ ), qual planejamento fatorial será empregado (completo  $2^J$  ou fracionário  $2^{J-b}$ ) e quantos experimentos serão realizados no ponto central (normalmente,  $2^J + 1$ ). O número de experimentos a ser realizado é dado por:  $2^J + 2J + 1$ . A FIGURA 2.10 ilustra os pontos do domínio experimental a ser explorado em um planejamento composto central para duas e três variáveis, respectivamente.



**FIGURA 2.10** Planejamentos compostos centrais: (a)  $J = 2$  e  $\alpha = 1.414 (\approx \sqrt{2})$ , (b)  $J = 3$  e  $\alpha = 1.682$ . Os diferentes símbolos significam: (•) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (○) ponto central.

Sendo um planejamento de segunda ordem, os modelos estatísticos envolvendo dois e três fatores da matriz do Planejamento Composto Central são representados pelas equações 2 e 3 respectivamente. [58]

$$R = a + bA + cB + dA^2 + eB^2 + fAB + \varepsilon \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde R: Resposta Experimental;

A, B e C: Variáveis a serem otimizadas;

*a*: termo independente que corresponde à média dos resultados;

*b, c*: coeficiente dos termos lineares;

*d, e*: coeficiente dos termos quadráticos;

*f*: coeficiente dos termos de interação;

$\varepsilon$ : erro experimental;

$$R = a + bA + cB + dC + eA^2 + fB^2 + gC^2 + hAB + iAC + jBC + \varepsilon \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde R: Resposta Experimental;

A, B e C: Variáveis a serem otimizadas;

*a*: termo independente que corresponde à média dos resultados;

*b, c, d*: coeficiente dos termos lineares;

*e, f, g*: coeficiente dos termos quadráticos;

*h, i, j*: coeficiente dos termos de interação;

$\varepsilon$ : erro experimental;

Através da análise da função da superfície de resposta, pode-se ter duas situações: Uma delas, é a função apresentar um máximo ou um mínimo (ponto crítico), que será calculado concluindo então o processo de otimização. A outra é, observar que a função não apresenta um ponto crítico e nesse caso, deve-se localizar uma nova região experimental de onde um novo planejamento deverá ser construído.

Para verificar a existência de pontos críticos, deve-se aplicar o critério de Lagrange, indicando se a ocorrência desses pontos são indicados por ponto de máximo, ponto de mínimo ou por ponto de sela. Esse critério baseia-se no cálculo do determinante Hessiano (H) da função que descreve a superfície de resposta, formada pela matriz simétrica das segundas derivadas parciais da função.

Para uma função quadrática de duas variáveis, tem-se:

$$H(A,B) = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} \end{vmatrix}$$

Onde: Existe máximo se  $H(A,B) > 0$  e  $\frac{\partial^2 R}{\partial A^2} < 0$ ;

Existe mínimo se  $H(A,B) > 0$  e  $\frac{\partial^2 R}{\partial A^2} > 0$ ;

Existe ponto de sela se  $H(A,B) < 0$ ;

Já, para uma função quadrática de três variáveis tem-se:

$$\Delta_1 = \frac{\partial^2 R}{\partial A^2}$$

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} \end{vmatrix}$$

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial C} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial C} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial C \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial C \partial B} & \frac{\partial^2 R}{\partial C^2} \end{vmatrix}$$

Onde: Não há nenhuma informação se:  $\Delta_2 = 0$ ;

Existe máximo se  $\Delta_1 < 0$  e  $\Delta_2 > 0$  e  $\Delta_3 < 0$ ;

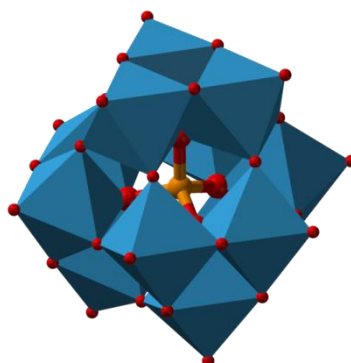
Existe mínimo se  $\Delta_1 > 0$  e  $\Delta_2 > 0$  e  $\Delta_3 > 0$ ;

Existe ponto de sela se nenhuma das situações acima for aplicada;

## 2.7. O MÉTODO DO AZUL DE MOLIBDATO PARA EXTRAÇÃO SELETIVA DE As(V)

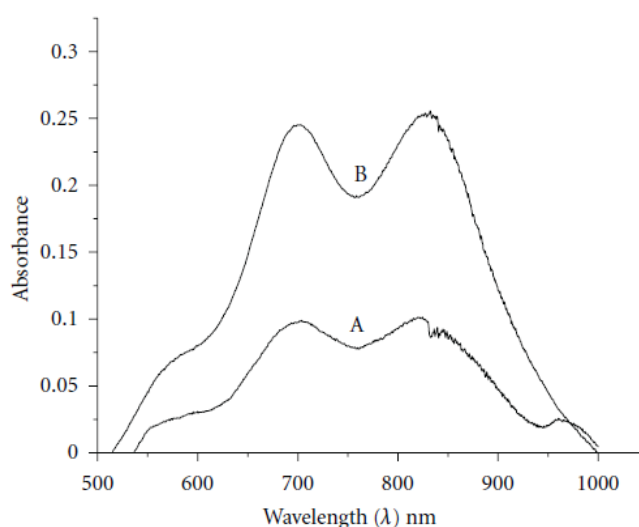
O método do azul de molibdato (AOAC 1995 [59]; AFNOR norma NFT 90-023 baseada na ISO 6878-1:1986 [60]) se baseia numa reação específica para o As (V), com aplicação em colorimetria por meio da detecção espectrofotométrica UV-Visível, em virtude da coloração azul do complexo heteropoliácido formado após redução, similarmente como ocorre para o ortofosfato. Como o arsenato e o fosfato apresentam propriedades químicas semelhantes, então arsenato também pode ser determinado pela maioria dos métodos usados para determinação de (orto)fosfato. [61]

Heteropoliácidos são uma classe de ácidos constituídos por uma combinação particular de hidrogênio e oxigênio com certos metais ou não metais. São frequentemente utilizados como catalisador ácido em reações químicas. Para ser considerado um heteropoliácido, um composto deve conter necessariamente um metal como tungstênio, molibdênio ou vanádio (denominados metais adendos), oxigênio, um elemento heteroátomo geralmente pertencente ao bloco p da tabela periódica como silício, fósforo ou arsênio além de átomos de hidrogênio ácidos. Devido às possibilidades de existirem diferentes combinações de átomos adendos e diferentes tipos de heteroátomos, existem diversas classes de heteropoliácidos. Dois dos grupos mais bem conhecidos dentre estes, baseiam-se nas estruturas de Keggin ( $H_nXM_{12}O_{40}$ ) e de Dawson ( $H_nX_2M_{18}O_{62}$ ). O complexo de arseno-molibdato enquadra-se dentro das estruturas de Keggin, conforme mostra a FIGURA 2.11: [62]



**FIGURA 2.11** Estrutura genérica para a classificação de Keggin, como  $H_3X^{n+}M_{12}O_{40}$ , em que X = P, As e M = Mo, W.

O método colorimétrico de determinação de arsenato, baseado na reação do azul de molibdato, geram espécies que absorvem em 700 ou 800 nm de comprimento de onda, selecionados de acordo com a sensibilidade requerida (FIGURA 2.12). KUMAR e PANDURANGAPPA. desenvolveram um método sensível para quantificação de níveis traço de arsênio em amostras biológicas e ambientais através desse método colorimétrico após extração por ponto nuvem utilizando Triton X-114 e detecção por espectrofotometria UV-vis em 690 nm. Com as condições ótimas, os autores conseguiram alcançar um limite de detecção de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , compreendendo uma faixa linear de  $10 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$ , com desvio padrão relativo de 1,2 %. [63]



**FIGURA 2.12** Espectro de absorção do complexo azul de molibdato após extração por ponto nuvem: (A) Branco; (B) Amostra. Extraído de KUMAR e PANDURANGAPPA. The Scientific World Journal (2012). [63]

Apesar da sensibilidade alcançada, essa forma de detecção está sujeita à várias interferências provenientes de erros sistemáticos que podem conduzir a resultados equivocados. Um sério problema que pode ser apontado, é quando se deseja fazer a medição da absorvância do complexo azul de molibdato na presença de fosfato e silicato. Esses íons são potenciais interferentes dessa reação, resultando numa coloração mais intensa, podendo prejudicar a qualidade dos brancos analíticos. Esse erro é solucionado empregando técnicas de espectroscopia atômica de detecção como o HG AAS e o GF AAS, que já apresentam alta seletividade consolidada pela própria natureza das técnicas. Entretanto para a técnica de HG AAS, o sistema em linha para a formação do hidreto volátil de arsênio pode se tornar turbulento com a formação de espuma, devido à presença do surfactante, comprometendo a detecção. Além disso, o efeito da

pré-concentração é anulado pelo consumo de grandes volumes de reagentes, ocasionando a diluição do complexo em um sistema de fluxo contínuo.

A técnica GF AAS se mostra ideal para ser utilizada como detecção, por já ser uma técnica de alta sensibilidade que quando combinada com a extração por ponto nuvem, podem proporcionar limites de detecção extremamente baixos.

Diante da seletividade da reação do complexo de azul de molibdato para o As(V), tem-se disponível uma ferramenta bastante promissora para especificação de arsênio inorgânico, discriminando a espécie mais oxidada das demais espécies. Logo, o desenvolvimento desta metodologia foi realizada em função da espécie As(V) ao invés da espécie As(III). De acordo com a literatura, é bem mais vantajoso trabalhar com a espécie As(V) em por duas razões: uma delas é decorrente da alta toxicidade da espécie As(III), o que pode expor o analista à condições insalubres; o outro motivo é que alguns processos de tratamento para o As(III) são menos eficientes, se tratando da relativa mobilidade dessa espécie, e além disso os procedimentos de oxidação e os reagentes empregados são mais simples e acessíveis do que os envolvidos nos processos de redução. [64]

### 3 - OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia analítica simples e altamente sensível para determinação de arsênio inorgânico em amostras regionais de arroz, avaliando a disponibilidade deste contaminante nos vários beneficiamentos de consumo, consistindo nos seguintes aspectos:

- Estabelecer condições ótimas para as variáveis influentes na extração das espécies inorgânicas de arsênio por ponto nuvem sem a necessidade de aquecimento, aprimorando a sensibilidade da técnica de detecção por meio de pré-concentração;
- Estabelecer condições ótimas de detecção espectroatômica por meio de atomização eletrotérmica em forno de grafite, com a obtenção de um programa de temperatura eficiente para as amostras tratadas em meio micelar;
- Discriminar os teores de As(V) e As total nas amostras por meio de extração seletiva, e com isso ter-se a especificação em função da toxicidade das formas inorgânicas desse contaminante;

## 4 - PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 – EQUIPAMENTOS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

A determinação de arsênio foi realizado em um espectrômetro de absorção atômica Varian AA 240Z, equipado com atomizador eletrotérmico em forno de grafite GTA 120, auto-amostrador acoplado PSD 120, e corretor de radiação de fundo não específica (background) por efeito Zeeman. Todas as medidas de leitura, foram obtidas por meio de absorbância integrada da área do sinal transiente.

Como fonte de radiação, utilizou-se lâmpada de catodo oco de arsênio Varian (Part No.: 5610122200; Serial/Lot No.: 12HO796), operando de acordo com as condições recomendadas. Tubos de grafite com revestimento pirolítico e com plataforma de L'vov inserida (Part No.: 63-100037-00; Batch No.: 101816924) foram utilizados como atomizadores eletrotérmicos. O volume total de amostra injetada foi de 20  $\mu\text{L}$  em todos os experimentos. Os parâmetros instrumentais seguiram as recomendações do fabricante e são apresentadas na TABELA 4.1. O programa de temperatura, também seguiu conforme o recomendado, com excessão das temperaturas de pirólise e atomização. Como gás inerte, utilizou-se argônio de alta pureza (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil).

Uma centrífuga (Kindly KC5) foi utilizada para facilitar o processo de separação das fases. Os valores de pH foram medidos potenciometricamente através de um pHmetro digital (GEHAKA PG1800, São Paulo, Brasil) e para o preparo das amostras, foi utilizado um banho de ultra-som (Ultra Cleaner 1400, Unique).

**TABELA 4.1** Parâmetros instrumentais recomendados pelo fabricante para determinação de As por GF AAS.

Parâmetro	As
Linha de absorção ( $\lambda$ ) (nm)	193,7
Largura da fenda espectral (nm)	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	10,0
Vazão de Ar ( mL min <sup>-1</sup> )	300,0
Tempo de integração de sinal (s)	5,0

## 4.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo de soluções e padrões, foi utilizada água deionizada de alta pureza obtida pelo sistema de purificação GEHAKA, São Paulo, Brasil. Para o preparo das amostras, foi utilizada água ultrapura obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) de resistividade 18,0 M $\Omega$  cm. Os frascos plásticos, bem como todas as vidrarias utilizadas nos experimentos e os “vials” que receberam as amostras foram previamente descontaminados em banho de HNO<sub>3</sub> (Merck) 10% vv<sup>-1</sup> por 24 horas. Posteriormente, os materiais foram lavados várias vezes com água deionizada e deixados para serem secos à temperatura ambiente. Foi utilizada também HNO<sub>3</sub> (Merck) 0,1% vv<sup>-1</sup> como solução de limpeza do capilar no equipamento entre as injeções das amostras nos tubos atomizadores.

A solução padrão de As(III) foi preparada dissolvendo-se a quantidade apropriada de NaAsO<sub>2</sub> (Vetec) em 25 mL de NaOH (Synth) 0,18 mol L<sup>-1</sup> e em seguida acidificado com HCl (Scharlau) 0,3 mol L<sup>-1</sup>. [9] Este procedimento torna o meio não-oxidante, evitando assim a conversão de As(III) a As(V). A solução padrão de As (V) por sua vez, foi preparada dissolvendo-se a quantidade apropriada de AsHNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Fluka) em água. Soluções padrões de trabalho foram obtidas por diluição a partir da solução estoque de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A solução de molibdato foi preparada a partir do sal (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.7H<sub>2</sub>O (Vetec) dissolvido em água na concentração de 0,015 mol L<sup>-1</sup>. Soluções de ácido ascórbico (Synth) 0,01 mol L<sup>-1</sup> e de NaCl (Isofar) 0,6% mv<sup>-1</sup> foram preparadas diariamente pela dissolução das quantidades apropriadas desses reagentes em água, a fim de serem empregadas como agente redutor do complexo de arsênio-molibdato e como eletrólito, respectivamente.

Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 mol L<sup>-1</sup> foi preparada a partir do reagente P.A (Scharlau) 96,5% em massa, para ajuste do pH do meio. Foi preparada também solução de KMnO<sub>4</sub> (Synth) 1,89 $\times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> como agentes oxidante.

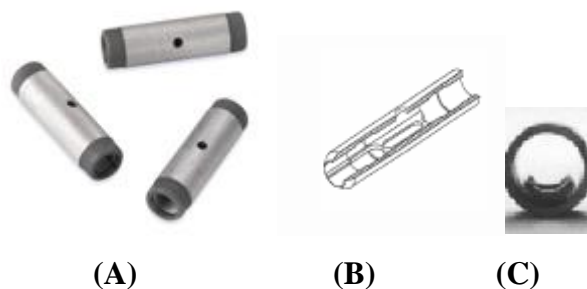
Como surfactante foi utilizada soluções de Triton X-114 (Sigma-Aldrich) em termos de % m/v, pois apesar de ser líquido, este apresenta alta viscosidade, dificultando seu preparo por meio de medidas de volume. Para diluição da fase rica, foi empregada uma solução diluente formada por HNO<sub>3</sub> (Merck) 0,1 mol L<sup>-1</sup> em metanol (Fmaia).

### 4.3 - MODIFICAÇÃO DOS TUBOS DE GRAFITE

O emprego de modificadores, tem demonstrado importância significativa na performance de métodos que envolvem atomização eletrotérmica, sobretudo em relação as vantagens que os modificadores permanentes podem apresentar sobre os modificadores químicos convencionais. Para tanto, foi feito um estudo inicial, utilizando tubos modificados permanentemente sobre a sensibilidade do arsênio.

Para modificação dos tubos de grafite, foram utilizados padrões para essa finalidade na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  dos seguintes modificadores: Paládio (Fluka), Irídio (Fluka), Ródio (Fluka), Nióbio (Fluka), Titânio (Fluka), Tântalo (Sigma Aldrich) e Zircônio (Fluka).

Os tubos de grafite foram tratados de acordo com um programa de temperatura específico para recobrimento com os modificadores permanentes, sendo tal procedimento indicado por GIACOMELLI e colaboradores (2002). [65] Este programa de aquecimento está retratado na TABELA 4.2. Com esse programa, houve o revestimento da parede interna e da plataforma do tubo de grafite (FIGURA 4.1) com cada um desses modificadores. Os resultados obtidos com o estudo destes modificadores foram comparados com o que foi obtido com o tubo sem nenhuma modificação.



**FIGURA 4.1** (A) Tubos de grafite com plataforma de L'vov integrada e temperatura estabilizada (STPF), (B) Corte transversal e (C) Visão longitudinal.

Em um tubo de grafite com plataforma já inserido no atomizador, foi injetado um volume adequado do padrão do modificador por meio do pipetador automático do auto-amostrador do equipamento. Em seguida, esse tubo foi submetido ao programa de temperatura construído, sendo esse procedimento repetido 20 vezes sucessivamente, obtendo então, um tubo de grafite com deposição de  $500 \mu\text{g}$  do modificador. Esse procedimento foi realizado para obtenção dos tubos tratados com cada um dos modificadores citados anteriormente.

**TABELA 4.2** Programa de temperatura utilizado para o tratamento dos tubos de grafite e da plataforma interna com os modificadores permanentes.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura ( °C)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Fluxo de Ar (mL min<sup>-1</sup>)</b>
1	95,0	5,0	300,0
2	120,0	20,0	300,0
3	1000,0	15,0	300,0
4	1000,0	3,5	300,0
5	1000,0	3,0	0,0
6*	2000,0	1,5	0,0
7*	2000,0	3,0	0,0
8	2000,0	3,0	300,0
9	40,0	20,0	300,0

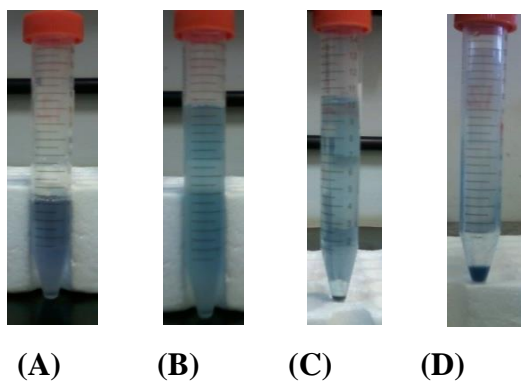
\* Etapas que constituem aquisição do sinal (leitura).

#### 4.4 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

Os experimentos de extração e pré-concentração por ponto nuvem foram realizados em tubos de centrífuga de 15,0 mL, onde o volume final ajustado após a adição de todos os reagentes foi de 10,0 mL. Nesses tubos, fez-se a adição de uma alíquota de 2,000 mL da solução padrão de As(V)  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  ou da amostra, seguida da adição de 0,400 mL de ácido sulfúrico  $1,250 \text{ mol L}^{-1}$  para ajuste do pH. Em seguida, adicionou-se 0,566 mL solução do complexante molibdato  $0,015 \text{ mol L}^{-1}$  e de 0,100 mL da solução de ácido ascórbico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ . Os tubos foram agitados por 5,0 minutos para garantir a formação do complexo de arseno-molibdato reduzido (azul de molibdato), e após o tempo de complexação, foram adicionadas 2,000 mL da solução do surfactante Triton X-114  $0,300\% \text{ mv}^{-1}$  e 0,133 mL do eletrólito NaCl  $0,600\% \text{ mv}^{-1}$  para indução do ponto nuvem sem a necessidade de aquecimento, fazendo uma rápida agitação para homogeneização.

A mistura foi levada para centrifugação a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos para ocorrência de separação das fases e levados para refrigeração durante 15 minutos para aumentar a viscosidade da fase rica e facilitar a retirada da fase aquosa pela inversão dos tubos. Com o auxílio de uma micropipeta, o restante da fase aquosa pobre foi cuidadosamente retirada e descartada.

Para diminuir a viscosidade da fase rica com a dissolução das micelas e então possibilitar a injeção no forno de grafite, a mesma foi diluída com 100  $\mu\text{L}$  da solução diluente de  $\text{HNO}_3/\text{MeOH}$ . Com o auxílio de uma micropipeta, o conteúdo foi transferido para os “vials” do auto-amostrador do equipamento, injetadas no tubo atomizador e submetidos ao programa de temperatura do GF AAS para obtenção das leituras de As(V) pré-concentradas nas amostras. As FIGURAS 4.2, 4.3 e 4.4 ilustram cada uma das etapas realizadas.



**FIGURA 4.2** (A) Formação do complexo azul de molibdato. (B) Adição do Triton X-114 e do NaCl após a formação do complexo. (C) Após centrifugação, com a separação definida das fases rica e aquosa. (D) Após a adição do diluente e pronto para ser injetado no GF AAS.



**FIGURA 4.3** Pipetador automático do equipamento GF AAS recolhendo a amostra presente nos “vials” do auto-amostrador (Laboratório de Espectroscopia Aplicada – LEA, IQ-UFU).



**FIGURA 4.4** Injeção da amostra no atomizador eletrotérmico do forno de grafite (Laboratório de Espectroscopia Aplicada – LEA, IQ-UFU).

A aquisição do sinal analítico foi feita por meio de integração da área do sinal transiente, sendo denominada a absorbância integrada como fator de resposta. Essa forma de aquisição foi empregada preferencialmente em relação à altura de pico, uma vez que esse modo de leitura é menos susceptível a variações nas condições de atomização. Soluções em branco, submetidas ao mesmo procedimento foram realizados em paralelo para correção dos erros experimentais.

#### 4.5 - OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

A otimização do método de extração e pré-concentração de As(V) por ponto nuvem e detecção em forno de grafite As(V)-CPE-GF AAS, consistiu basicamente em duas etapas: A primeira etapa foi a otimização do sistema de detecção pelo forno de grafite, empregando condições preliminares de extração baseada de acordo com as condições reportadas por KUMAR e PANDURANGAPPA (2012), [63] a fim de obter um programa de temperatura eficiente para o extrato não-aquoso contendo As(V) pré-concentrado. Tal estudo de otimização foi realizado de modo multivariado com emprego de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.

Tendo então, otimizada as condições de detecção, a segunda etapa consistiu na otimização das variáveis influentes no procedimento de extração por ponto nuvem. Esta etapa foi realizada seguindo primeiramente a otimização univariada do pH, visto que se trata da variável de maior importância, garantindo assim a formação efetiva do complexo arseno-molibdato. As demais variáveis foram otimizadas de modo multivariado, empregando também planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.

##### 4.5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA

Após a realização do estudo dos modificadores, foi feita uma triagem preliminar para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização, e assim compor um programa de temperatura ideal para as amostras submetidas à extração por ponto nuvem. O procedimento usado foi o mesmo indicado no item 4.4, utilizando inicialmente solução padrão de As(V)  $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Como primeira etapa da otimização, foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  completo, onde os fatores que foram investigados foram: temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA) e modificador (MOD). Para cada uma dessas variáveis foram determinados dois níveis distintos (inferior e superior), sendo que para o modificador, foram selecionados os dois tubos modificados que apresentaram melhor sensibilidade para composição do planejamento. A TABELA 4.3 apresenta a matriz do planejamento fatorial com níveis experimentais estudados para cada fator. As leituras foram realizadas aleatoriamente e em triplicata. As respostas obtidas foram tratadas pelo software Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001).

**TABELA 4.3** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  completo para o programa de temperatura.

<b>Experimento</b>	<b>TP (°C)</b>	<b>TA (°C)</b>	<b>MOD</b>
1	800 (-1)	2100 (-1)	Tubo 1 (-1)
2	1400 (1)	2100 (-1)	Tubo 1 (-1)
3	800 (-1)	2400 (1)	Tubo 1 (-1)
4	1400 (1)	2400 (1)	Tubo 1 (-1)
5	800 (-1)	2100 (-1)	Tubo 2 (1)
6	1400 (1)	2100 (-1)	Tubo 2 (1)
7	800 (-1)	2400 (1)	Tubo 2 (1)
8	1400 (1)	2400 (1)	Tubo 2 (1)

Após a realização dos experimentos do planejamento fatorial, foram avaliados os efeitos dos fatores, bem como os efeitos de interação entre os mesmos sobre o sinal de resposta. Diante dos resultados, construiu-se um planejamento composto central (CCD) para modelar uma superfície de resposta de onde se pode obter as condições ótimas das variáveis estudadas.

Como o modificador se trata de variável qualitativa, não sendo possível que este seja refinado, foi fixado para os próximos experimentos o tubo modificado que apresentou o melhor resultado de acordo com o planejamento fatorial. Na sequência da otimização, foi realizado um planejamento composto  $2^2$  com cinco réplicas no ponto central, da qual foram exploradas as temperaturas de pirólise e atomização. A TABELA 4.4 apresenta a matriz do planejamento composto central, com os níveis estudados para esses fatores.

**TABELA 4.4** Matriz do planejamento composto  $2^2$  com ponto central para otimização multivariada das temperaturas de pirólise e atomização.

<b>Experimento</b>	<b>TP (°C)</b>	<b>TA (°C)</b>
1	741 (-1)	1850 (-1)
2	741 (-1)	2450 (+1)
3	1341 (1)	1850 (-1)
4	1341 (1)	2450 (+1)
5	617 ( $-\sqrt{2}$ )	2150 (0)
6	1465 ( $\sqrt{2}$ )	2150 (0)
7	1041 (0)	1726 ( $-\sqrt{2}$ )
8	1041 (0)	2574 ( $\sqrt{2}$ )
9 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)
10 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)
12 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)
12 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)
13 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)

P.C.: Ponto Central

Condições preliminares CPE:  $[\text{H}_2\text{SO}_4]$   $0,0875 \text{ mol L}^{-1}$ ; [Molib]  $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ ; [HAsc]  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; [Triton X-114]  $0,8\% \text{ mv}^{-1}$  e [NaCl]  $0,0024\% \text{ mv}^{-1}$ .

## 4.5.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

### 4.5.2.1 ESTUDO DO EFEITO DO pH

Para que ocorra a formação do complexo hidrofóbico heteropoliácido azul de molibdato, deve-se submeter o meio reacional acidificado necessariamente com ácido sulfúrico. Sem a qual, a extração torna-se inviável, pois sem a formação do complexo o As(V) não seria extraído, uma vez que o meio extrator é de natureza orgânica micelar.

Considerando que o pH exerce alto efeito na eficiência de extração, sendo esta a variável principal, foi realizado um estudo à parte para verificar a influência do pH do meio. Este estudo compreendeu a extração de arsenato no intervalo de pH 0,3 – 4,5 de forma univariada, com intuito de estabelecer um pH ótimo dentro de uma faixa de concentração ácida em que a formação do complexo é favorecida. Em vista da boa sensibilidade conseguida já com a otimização do programa de temperatura, passou a ser empregado solução padrão de As(V) na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para os próximos ensaios de pré-concentração, a fim de evitar a saturação do sinal de resposta na etapa de detecção.

### 4.5.2.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Após determinado o programa de temperatura ideal e o pH ótimo da extração do sistema As(V)-CPE-GF AAS, as demais variáveis que influenciam na pré-concentração do mesmo tais como, a concentração do complexante molibdato, a concentração do redutor ácido ascórbico, a concentração do surfactante Triton X-114 e a concentração do eletrólito NaCl foram otimizadas. Primeiramente, realizou-se uma triagem dessas variáveis por meio de um planejamento fatorial  $2^4$  completo de onde foi possível avaliar a significância dos efeitos de cada variável bem como das suas interações. Foi realizado também um experimento no ponto central (P.C.) para avaliar se uma relação não-linear do modelo empírico apresenta efeito significativo. O procedimento usado foi o mesmo descrito no ítem 3.4, utilizando agora solução padrão de As(V)  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A TABELA 4.5 apresenta a matriz do planejamento fatorial com os níveis experimentais estudados para cada uma dessas variáveis. As leituras foram realizadas aleatoriamente e em triplicata. Os resultados obtidos foram tratados pelo software Statistica 6.0.

**TABELA 4.5** Matriz do planejamento fatorial  $2^4$  completo para o sistema As(V)-CPE-GF AAS.

<b>Experimento</b>	<b>[Molib]</b> <b>(mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[HAsc]</b> <b>(mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[Triton X-114]</b> <b>(% mv<sup>-1</sup>)</b>	<b>[NaCl]</b> <b>(% mv<sup>-1</sup>)</b>
1	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)
2	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)
3	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)
4	3,000 (1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)
5	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,024 (-1)
6	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,024 (-1)
7	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,024 (-1)
8	3,000 (1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,024 (-1)
9	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,120 (1)
10	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,120 (1)
11	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,120 (1)
12	3,000 (1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,120 (1)
13	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,120 (1)
14	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,120 (1)
15	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,120 (1)
16	3,000 (1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,120 (1)
17 (P.C.)	1,700 (0)	1,120 (0)	0,090 (0)	0,072 (0)

Diante dos resultados encontrados, as variáveis que apresentaram efeitos principais e interações significativas, foram selecionadas para serem exploradas por meio de planejamento composto central. Este planejamento CCD permite a construção de uma superfície de resposta de acordo com um modelo não-linear, que quando se aplica o critério de Lagrange, obtém-se os valores críticos das variáveis que nesse caso informam as condições de maximização do sinal de resposta.

A TABELA 4.6 apresenta a matriz do planejamento composto  $2^3$  com cinco réplicas no ponto central, com os níveis experimentais estudados para as variáveis selecionadas. As leituras foram realizadas aleatoriamente e em triplicata. Os resultados obtidos foram tratados pelo software Statistica 6.0.

**TABELA 4.6** Matriz do planejamento composto  $2^3$  com ponto central para otimização multivariada do sistema As(V)-CPE-GF AAS.

<b>Experimento</b>	<b>[Molib] (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[HAsc] (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[NaCl] (% mv<sup>-1</sup>)</b>
1	0,4000 (-1)	0,0500 (-1)	0,0045 (-1)
2	0,4000 (-1)	0,0500 (-1)	0,0130 (1)
3	0,4000 (-1)	0,1500 (1)	0,0045 (-1)
4	0,4000 (-1)	0,1500 (1)	0,0130 (1)
5	1,2000 (1)	0,0500 (-1)	0,0045 (-1)
6	1,2000 (1)	0,0500 (-1)	0,0130 (1)
7	1,2000 (1)	0,1500 (1)	0,0045 (-1)
8	1,2000 (1)	0,1500 (1)	0,0130 (1)
9	0,1300 (-1,68)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
10	1,5000 (1,68)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
11	0,8000 (0)	0,0160 (-1,68)	0,0090 (0)
12	0,8000 (0)	0,18000 (1,68)	0,0090 (0)
13	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0018 (-1,68)
14	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0160 (1,68)
15 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
16 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
17 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
18 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)
19 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)

#### 4.6 - TESTE DE INTERFERENTES

O estudo de íons interferentes foi realizado com a finalidade de verificar a seletividade do método proposto sobre a determinação de As(V). Os íons concomitantes fostato, silicato, nitrato, fluoreto, potássio e selênio total, foram selecionados de acordo com as substâncias presentes na composição das amostras de arroz, conforme indicado na TABELA 2.1 no item 2.2 da revisão bibliográfica. O íon tartarato foi incluído como concomitante, uma vez que o ácido tartárico pode promover interferência, mascarando a ação de uma possível formação do complexo azul de molibdato com o fostato ou com a sílica, que também são elementos que dão teste positivo para o complexo. [63]

Tradicionalmente, o estudo de íons interferentes é realizado de forma univariada, adicionando à solução de trabalho uma concentração conhecida de apenas um íon de cada vez, ou então ir aumentando gradativamente a concentração desse íon concomitante até o limite de tolerância, que é onde se obtém o decréscimo da intensidade do sinal analítico em uma porcentagem definida como ação de interferência.

Este tipo de estudo requer um longo tempo, não sendo possível obter informações das interações dos efeitos entre os íons, além de não representar uma situação real na qual uma amostra pode conter simultaneamente vários íons. [66] Por esse motivo, foi realizado neste trabalho o estudo de interferentes de forma multivariada, baseado num planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  de resolução IV, resultando num total de 16 experimentos. A composição do planejamento bem como os níveis selecionados para cada íon (indicando a presença ou a ausência do íon concomitante) estão definidos na TABELA 4.7.

**TABELA 4.7** Níveis e fatores utilizados para avaliação dos íons concomitantes selecionados para composição do planejamento fatorial fracionário.

<b>Interferente (Fator)</b>	<b>Nível (-1) (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Nível (1) (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
Fosfato	0,0	5000,0
Silicato	0,0	5000,0
Nitrato	0,0	5000,0
Fluoreto	0,0	5000,0
Tartarato	0,0	5000,0
Potássio	0,0	5000,0
Selênio	0,0	5000,0

#### 4.7 - ESTUDO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO

A fim de testar a seletividade do método proposto, foram realizados alguns experimentos de detecção de ambas as formas inorgânicas de arsênio com introdução direta das soluções padrões de As(III) e As(V) preparadas separadamente e simultaneamente nas concentrações finais de 10,0 e 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foram realizadas também a detecção das espécies após procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem, sobre as mesmas condições, também nas concentrações 1,0 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , bem como a detecção da espécie As(III) após etapa de oxidação com  $\text{KMnO}_4$ .

#### 4.8 - FIGURAS DE MÉRITO

Já definidas as melhores condições que afetam a detecção (programa de temperatura do GF AAS) e a pré-concentração de As(V) mediante extração por ponto nuvem, foram estabelecidos alguns parâmetros afim de avaliar o desempenho analítico do método proposto, tais como a faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, fator de enriquecimento, precisão intra e inter-ensaio e exatidão.

A precisão foi avaliada como desvio padrão relativo (DPR / %), sendo estimados em 10 ensaios realizados sequencialmente no mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em cinco dias diferentes (precisão inter-ensaio). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados respectivamente como 3 vezes e 10 vezes o desvio padrão dos brancos, divididos pelo coeficiente angular (inclinação) da curva de calibração pré-concentrada obtida com o sistema As(V)-CPE-GF AAS. Foram realizados para tanto, 10 medidas de soluções em branco submetidas à metodologia.

O fator de enriquecimento foi obtido pela razão dos coeficientes angulares das curvas obtidas com e sem o sistema de extração por ponto nuvem, afim de estimar a eficiência da pré-concentração, sendo essa última obtida pela análise direta da solução de As(V) no GF AAS sem etapa de extração / pré-concentração.

A exatidão foi avaliada com os resultados obtidos das amostras de arroz analisadas por meio da adição e recuperação de As(V) em dois níveis de fortificação: 5,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.9 – PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de arroz foram obtidas diretamente da casa cerealista de processamento e beneficiamento situada na cidade de Catalão-GO. As amostras de arroz são de procedência de cultivo regional e foram classificadas de acordo com a sua forma de beneficiamento de consumo: arroz branco, arroz integral e arroz parboilizado.

Todas as amostras foram trituradas em um liquidificador de uso industrial (Bermar), homogeneizadas e peneiradas por meio de malhas para obtenção de um material particulado com granulometria  $\leq 250 \mu\text{m}$ . As amostras foram então armazenadas em dessecador antes do procedimento de digestão e extração.

Foram pesados 0,1 g da amostra finamente dividida em um frasco plástico de fundo cônico (Corning), no qual foram adicionados 10 mL de  $\text{HNO}_3$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  (Merck) e submetidas à sonicação por meio de um banho de ultra-som durante 136 minutos para extrair as espécies de arsênio que provavelmente podem estar presentes nas amostras. Tal procedimento foi realizado de acordo com as condições reportadas por PAULA et. al. [67]

Após a sonicação, o sobrenadante foi recolhido e submetido ao procedimento de pré-concentração por ponto nuvem e levado para detecção por GF AAS para a quantificação da espécie  $\text{As(V)}$ , segundo as condições da metodologia de extração seletiva  $\text{As(V)}$ -CPE-GF AAS aqui otimizadas. Com a finalidade de especificação, o sobrenadante da amostra digerida por sonicação também foi submetido a uma etapa prévia de oxidação para determinação de arsênio total, seguida da extração por ponto nuvem e a quantificação das demais espécies de  $\text{As}$  ( $_{sp}\text{As}$ ) foi determinada indiretamente por diferença, segundo item descrito a seguir.

#### 4.10 – PROCEDIMENTO DE ESPECIAÇÃO DE $\text{As}$ INORGÂNICO

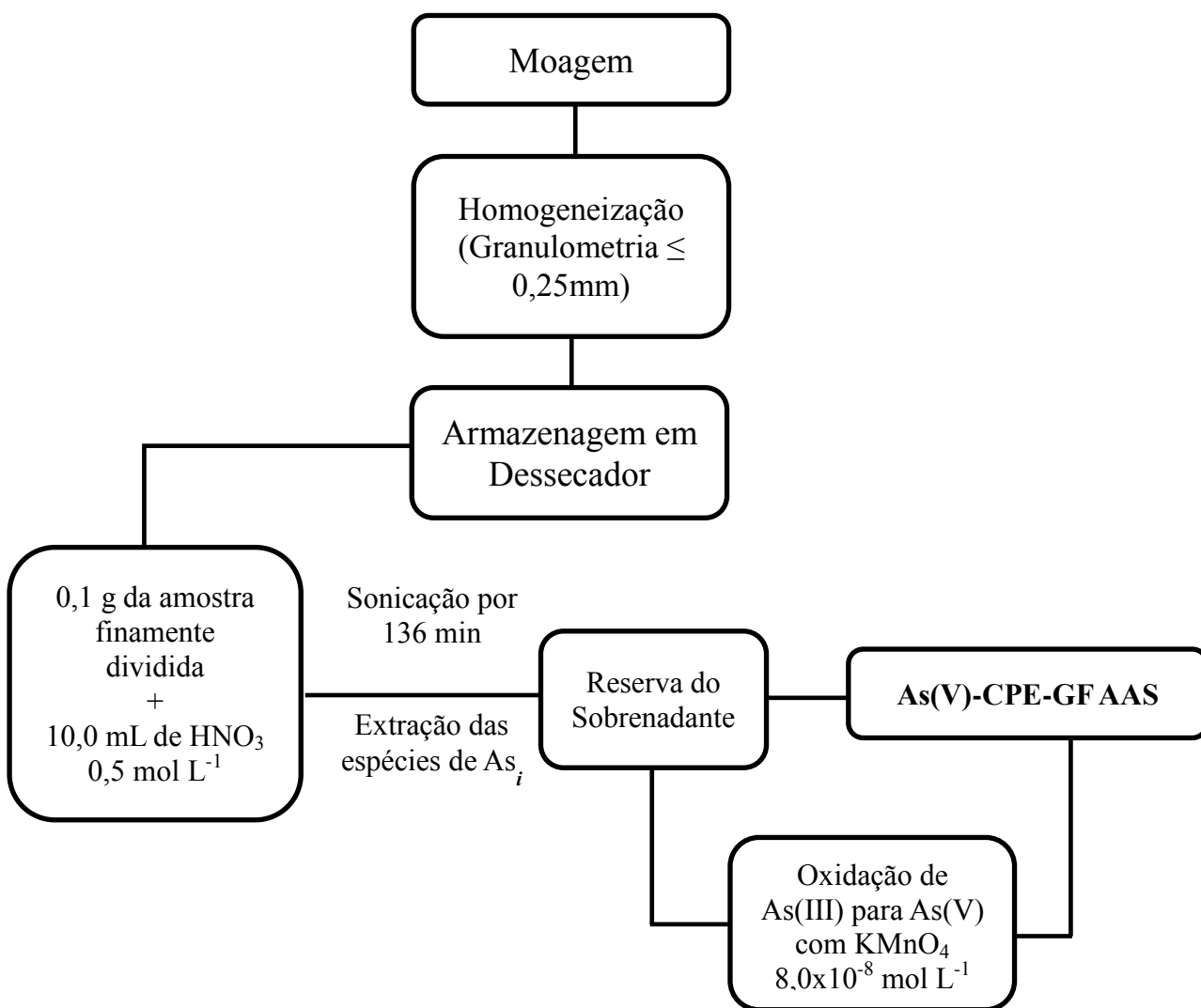
A discriminação dos teores de arsênio inorgânico quanto às formas de oxidação e da natureza das demais espécies, foi baseada primeiramente na extração seletiva de  $\text{As(V)}$  como dito anteriormente. A determinação de arsênio total  $\text{As}_t = [_{sp}\text{As} + \text{As(V)}]$  foi obtida mediante uma etapa de pré-oxidação do conteúdo sobrenadante, para então proceder a metodologia  $\text{As(V)}$ -CPE-GF AAS. Tendo obtido ambos os resultados, a determinação total das demais espécies pode então ser calculada pela diferença  $[\text{As}] - [\text{As(V)}]$ .

O procedimento da etapa de pré-oxidação foi conforme as condições reportadas por LENOBLE e colaboradores (2003), [61] que estudaram o efeito dos agentes oxidantes  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaOCl}$ ,  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{KMnO}_4$  sobre a eficiência de conversão de  $\text{As(III)}$  à  $\text{As(V)}$ , sendo este último detectado espectrofotometricamente por meio da reação colorimétrica azul de molidato, do qual também é baseada para as condições de extração de arsenato no presente trabalho. Dentre essas substâncias, o  $\text{KMnO}_4$  foi o que apresentou melhores resultados e maiores vantagens sobre os demais agentes oxidantes, uma vez que sua ação oxidante é pouco dependente do pH, além de não seguir uma

razão estequiométrica específica, isto é, um excesso de  $\text{KMnO}_4$  não compromete a oxidação completa de arsenito para arsenato. [61,68]

Para tanto, uma alíquota do sobrenadante após extração ultrassônica foi colocado nos tubos seguida pela adição de uma solução de  $\text{KMnO}_4$   $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . A mistura foi agitada por 30 minutos para garantir uma completa oxidação, e logo após foi submetida ao procedimento de extração/pré-concentração para determinação de arsênio inorgânico total. Com isso, obteve-se a especiação das formas As(III) e A(V) nas amostras de arroz analisadas.

A sequência experimental do procedimento de preparo das amostras bem como do estudo de especiação estão ilustradas no fluxograma (FIGURA 4.5).



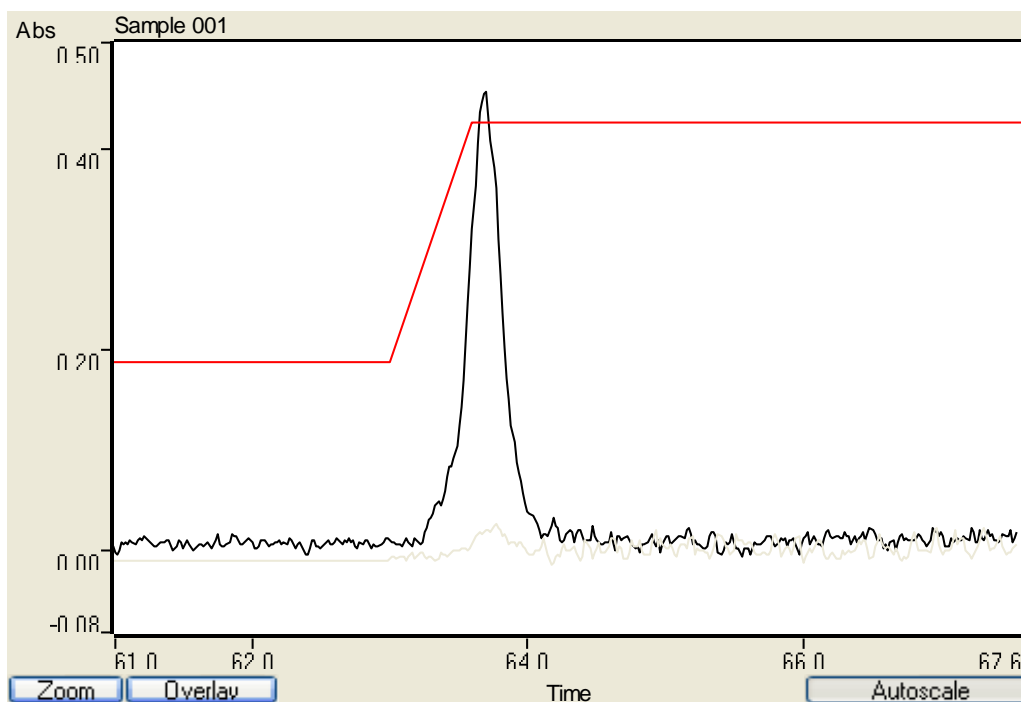
**FIGURA 4.5** Fluxograma das etapas de preparo das amostras de arroz para extração, pré-concentração e especiação de arsênio inorgânico.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

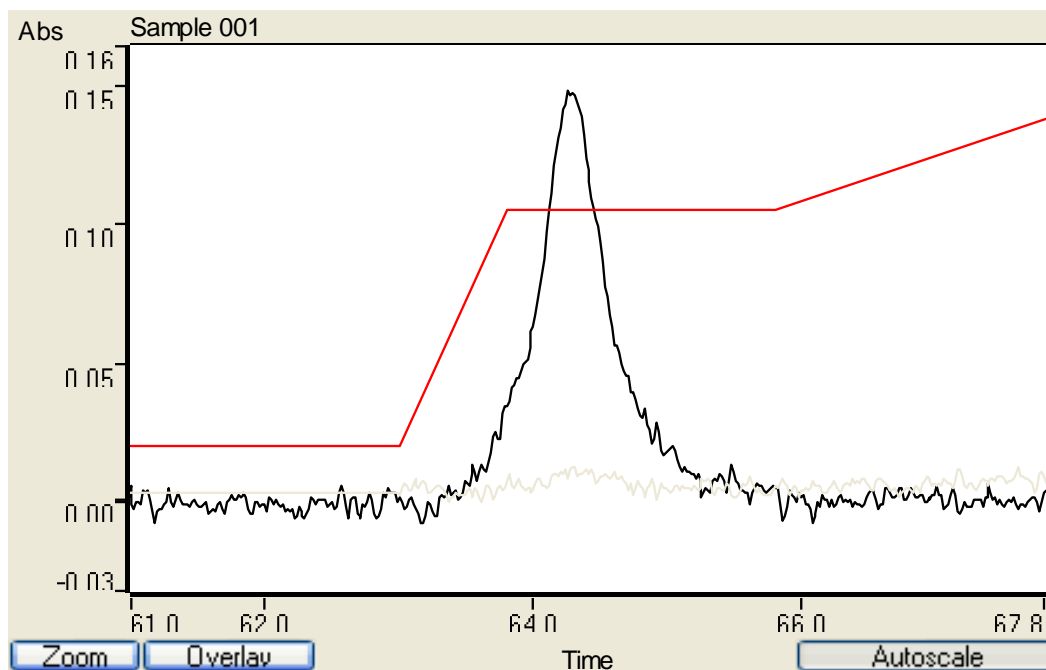
### 5.1 – ESTUDO DOS MODIFICADORES E OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA

Foi realizado um estudo preliminar de cada modificador disponível, buscando as melhores condições de detectabilidade para o mesmo, a fim de determinar as condições ótimas na detecção As(V) por GF AAS em meio não-aquoso após extração por ponto nuvem, e assim desenvolver um programa de temperatura eficiente. Os dois melhores resultados foram obtidos com os tubos tratados permanentemente com os modificadores irídio e nióbio, sendo estes então selecionados para os estudos de triagem no planejamento fatorial para determinação das temperaturas ótimas de pirólise e atomização nessas condições.

Para uma avaliação qualitativa do desempenho desses modificadores sobre a detectabilidade de As(V), foi apresentado nas FIGURAS 5.1 e 5.2, os sinais transientes de As(V) pré-concentrado obtidos respectivamente para os modificadores irídio e nióbio:



**FIGURA 5.1** Sinal transiente atômico (---) e de fundo (—) para o As(V)  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  após extração por ponto nuvem empregando irídio como modificador permanente.



**FIGURA 5.2** Sinal transiente atômico (---) e de fundo (---) para o As(V)  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  após extração por ponto nuvem empregando nióbio como modificador permanente.

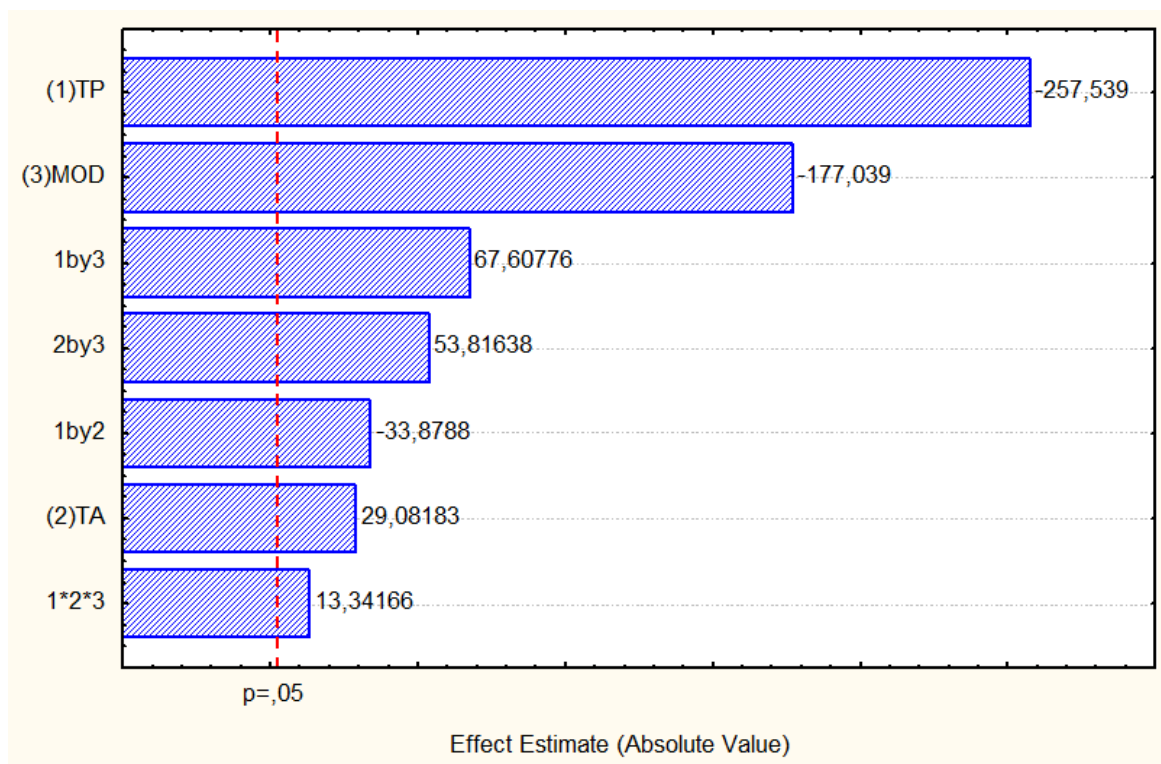
Os sinais transientes apontam para um melhor desempenho do modificador de irídio em relação ao nióbio, conseguindo aprimorar consideravelmente a sensibilidade de detecção, em uma resposta compatível com As(V) pré-concentrado em um meio extrator não-aquoso. Entretanto, por essa razão, o sinal de fundo observado foi ligeiramente maior quando comparada com a ação do nióbio no pico de leitura. A ação de ambos os modificadores, conseguiu reduzir drasticamente o efeito da radiação de fundo em comparação com um experimento realizado utilizando um tubo atomizador sem nenhuma modificação. Como se trata de um meio rico em surfactante, o emprego de modificadores torna-se crucial para que o sinal analítico seja predominante sobre o sinal de fundo, possibilitando uma melhora da relação sinal/ruído. Tais características puderam ser observadas com ambos modificadores.

Depois de selecionados os tubos modificados com irídio e com nióbio para a próxima etapa, que consiste na otimização multivariada do programa de temperatura, procedeu-se a execução do planejamento fatorial  $2^3$  completo, nas variações das temperaturas de pirólise e atomização. Com isso, consegue-se estimar as melhores condições experimentais que encaminham para a melhoria da sensibilidade. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 5.1.

**TABELA 5.1** Resultados do planejamento fatorial  $2^3$  completo para o programa de temperatura ( $n = 3$ ).

Experimento	Temperatura de Pirólise (°C)	Temperatura de Atomização (°C)	Modificador	Absorbância Integrada Média
1	800 (-1)	2100 (-1)	Ir (-1)	<b>0,1139</b>
2	1400 (1)	2100 (-1)	Ir (-1)	<b>0,0830</b>
3	800 (-1)	2400 (1)	Ir (-1)	<b>0,1164</b>
4	1400 (1)	2400 (1)	Ir (-1)	<b>0,0750</b>
5	800 (-1)	2100 (-1)	Nb (1)	<b>0,0822</b>
6	1400 (1)	2100 (-1)	Nb (1)	<b>0,0634</b>
7	800 (-1)	2400 (1)	Nb (1)	<b>0,0937</b>
8	1400 (1)	2400 (1)	Nb (1)	<b>0,0703</b>

A partir desses resultados, o efeito das variáveis e das suas interações puderam ser representadas por meio do gráfico de Pareto, conforme mostra a FIGURA 5.3:



**FIGURA 5.3** Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial  $2^3$  completo para o programa de temperatura.

De acordo com o gráfico de Pareto, pode-se observar que todos os efeitos principais foram significativos ao nível de 95% de confiança, exercendo grande influência na sensibilidade de detecção. Além disso, o gráfico de Pareto indica que todos os efeitos de interação, inclusive a interação de 3ª ordem também foram significativos, mostrando que um processo de otimização univariada não seria adequada para ser aplicada no desenvolvimento dessa metodologia. Essa é uma das informações mais importantes que podem ser exploradas em técnicas multivariadas de otimização, como no caso do planejamento fatorial.

A temperatura de pirólise foi a variável que apresentou maior efeito significativo, indicando por meio do sinal negativo do efeito que o sinal analítico é favorecido no nível de menor temperatura. O modificador também apresentou grande efeito significativo, mostrando que a contribuição para o aumento de sinal ocorre também no nível inferior. Como o irídio foi representado pelo nível inferior, este foi o modificador que apresentou melhor resposta e foi fixado no desenvolvimento dos experimentos das próximas etapas deste trabalho.

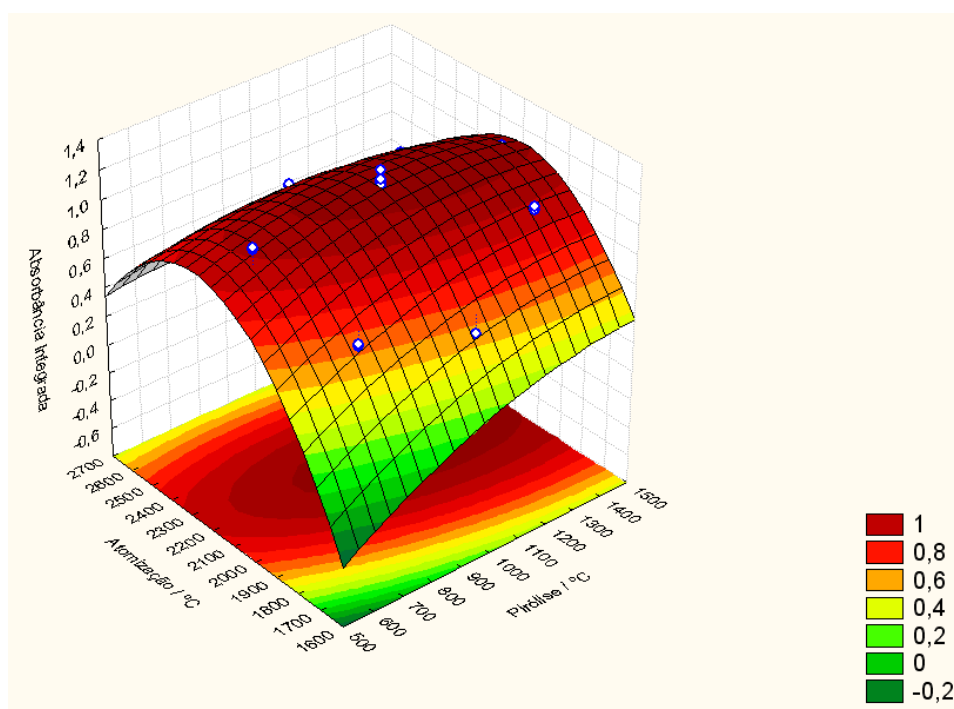
Temperatura de atomização mais alta foi indicada para aumento de sinal, entretanto o efeito da interação entre as temperaturas de pirólise (TP) e atomização (TA) foi mais significativa do que o seu efeito principal propriamente dito. A interação TPxTA apresentou efeito negativo, mostrando que quando TP e TA passam do nível inferior para o nível superior, houve queda do sinal analítico. Como o efeito principal da TP foi predominantemente significativa sobre TA, esta deve ser mantida fixa no nível indicado pelo gráfico de Pareto (800° C), e que a maior TA provavelmente pode ter sido responsável pela diminuição da intensidade do sinal. Logo menores temperaturas de atomização, no caso mais próximas de 2100°C, são indicadas.

Depois de selecionado o tubo modificado permanentemente com irídio, a próxima etapa consistiu na otimização das temperaturas de pirólise e atomização. Tendo já estabelecido o encaminhamento de quais condições devem ser exploradas para essas variáveis com base no gráfico de Pareto, foi executado um planejamento composto central (CCD) a fim de alcançar as condições ótimas por meio da construção da superfície de resposta. Os resultados obtidos do CCD para otimização de TP e TA, estão apresentadas na TABELA 5.2:

**TABELA 5.2** Resultados do planejamento composto central para otimização das temperaturas de pirólise e atomização ( $n = 3$ ).

Experimento	TP (°C)	TA (°C)	Absorbância Integrada Média
1	741 (-1)	1850 (-1)	<b>0,6284</b>
2	741 (-1)	2450 (+1)	<b>0,8006</b>
3	1341 (1)	1850 (-1)	<b>1,0155</b>
4	1341 (1)	2450 (+1)	<b>0,8371</b>
5	617 ( $-\sqrt{2}$ )	2150 (0)	<b>1,0862</b>
6	1465 ( $\sqrt{2}$ )	2150 (0)	<b>1,0402</b>
7	1041 (0)	1726 ( $-\sqrt{2}$ )	<b>0,5252</b>
8	1041 (0)	2574 ( $\sqrt{2}$ )	<b>0,7625</b>
9 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)	<b>1,1626</b>
10 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)	<b>1,1914</b>
12 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)	<b>1,1634</b>
12 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)	<b>1,1742</b>
13 (P.C.)	1041 (0)	2150 (0)	<b>1,1466</b>

A superfície de resposta obtida com esse CCD, está ilustrada na FIGURA 5.4:



**FIGURA 5.4** Superfície de resposta TP x TA x ABS. integrada obtido pelo CCD.

Os resultados foram tratados por meio da Análise de Variância (ANOVA) admitindo um nível de confiança de 95%, sendo que o modelo de regressão quadrática ofereceu bom ajuste com porcentagem explicada de 93%.

A função polinomial que rege este modelo, está mostrada na equação 4 abaixo:

$$\text{Abs} = -16,0674 + 0,0036 (T_P) - 0,00000067 (T_P)^2 + 0,0141 (T_A) - 0,000003 (T_A)^2 - 0,000001(T_P)(T_A) \quad (\text{Eq. 4})$$

Aplicando-se o critério de Lagrange, o ponto crítico foi encontrado informando consequentemente as temperaturas ótimas de pirólise e atomização. Com isso um programa de temperatura eficiente para detecção de As(V) após extração por ponto nuvem pode ser construído, sendo apresentado na TABELA 5.3:

**TABELA 5.3** Programa de temperatura otimizado para determinação de As(V) por GF AAS após extração por ponto nuvem, utilizando irídio como modificador permanente.

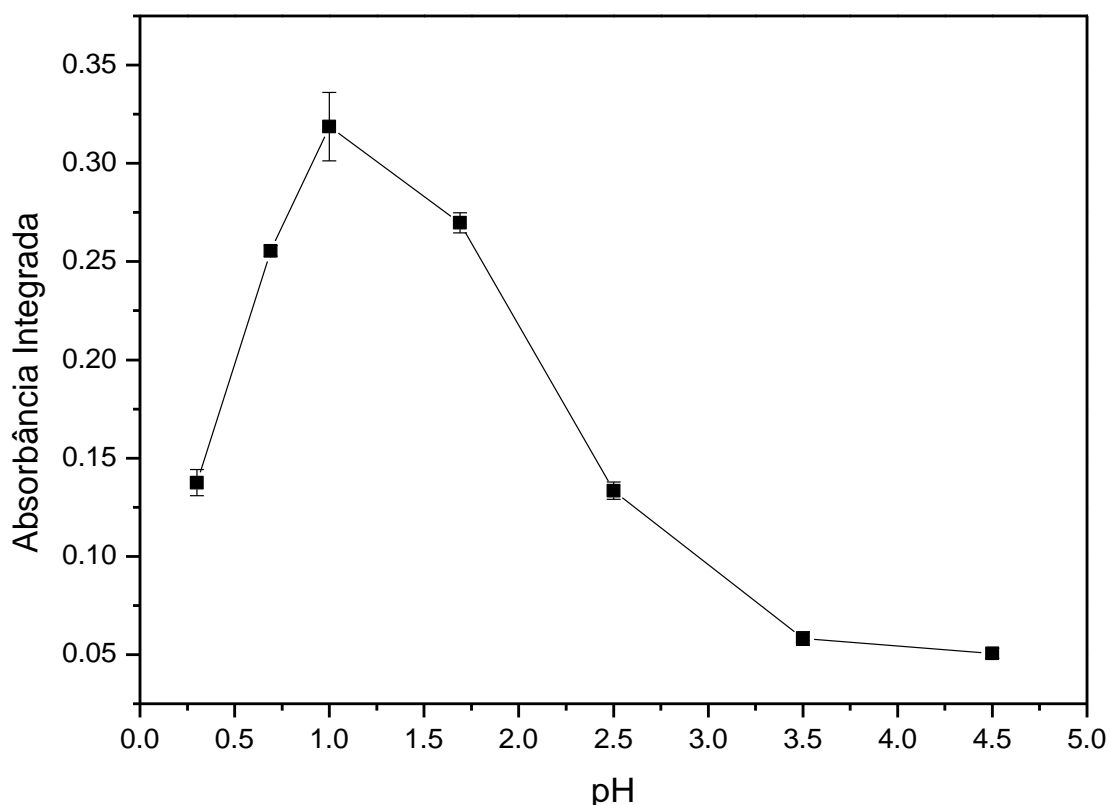
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Fluxo Argônio (L min<sup>-1</sup>)</b>
Secagem 1	85	5,0	0,3
Secagem 2	95	40,0	0,3
Secagem 3	120	10,0	0,3
<b>Pirólise</b>	<b>1148</b>	8,0	0,3
<b>Atomização</b>	<b>2155</b>	2,6	0,0
Limpeza	2600	2,0	0,3

Com as condições ótimas de detecção já determinadas, foi realizado então a otimização das condições de extração por ponto nuvem do sistema As(V)-CPE-GF AAS.

## 5.2 – OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO

### 5.2.1 . ESTUDO DO EFEITO DO pH

Considerando o pH como a variável principal, responsável pela formação efetiva do complexo azul de molibdato, foi realizado o estudo univariado para determinação do melhor pH na extração de As(V) dentro de uma faixa favorável de pH ácido. A FIGURA 5.5 apresenta o resultado do efeito do pH.

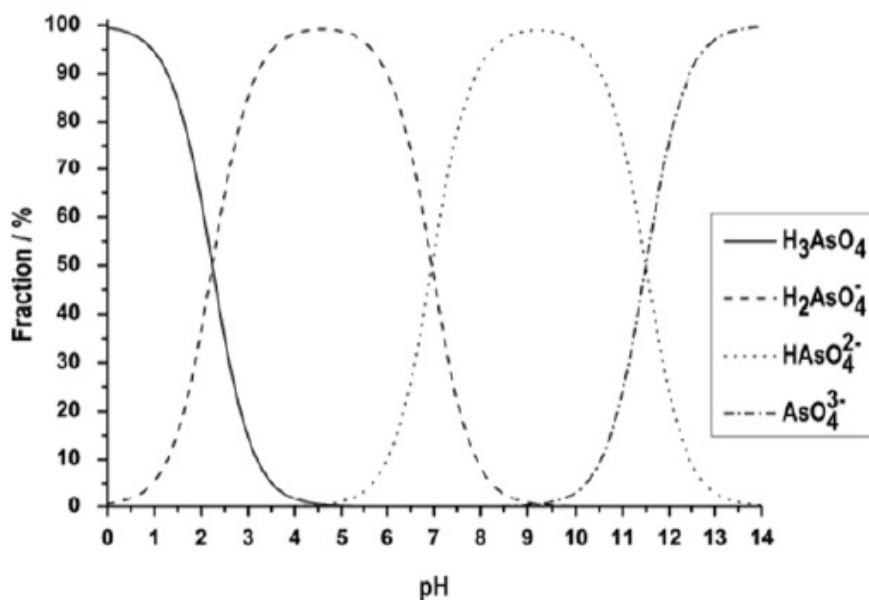


**FIGURA 5.5** Estudo do efeito do pH sobre a extração de As(V) por ponto nuvem ( $n = 3$ ).

Os resultados apontam para um máximo de absorbância em pH 1,0, sendo este valor considerado como pH ótimo. A reação do azul de molibdato, é caracterizada primeiramente pela formação do heteropoliácido 12-molibdoarsênico ( $H_3AsMo_{12}O_{40}$ ), sendo este então reduzido em seguida pela ação do ácido ascórbico para finalmente formar o complexo azul de molibdato propriamente dito (do qual é extraído). Esse processo ocorre necessariamente em meio ácido, baseada na equação 5 abaixo [69]:



Em um meio fortemente ácido ( $\text{pH} < 1,0$ ) o complexo tem baixa estabilidade devido à formação paralela de um precipitado [61]. O efeito que o pH exerce sobre a extração de As(V) está diretamente relacionado à distribuição das formas químicas dessa espécie, conforme é apresentado na FIGURA 5.6.



**FIGURA 5.6** Diagrama de distribuição das espécies de As(V) em função do pH. (Extraído de LEHMANN, E.L., et. al. Talanta, 104, 2013, 187-192)

A equação 4 mostra que a espécie reativa do As(V) é a espécie eletricamente neutra  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ , e esta ocorre predominantemente em pH baixo, com uma fração de cerca de aproximadamente 95% em pH 1,0. Logo esse pH oferece uma condição reacional ideal para a ocorrência da formação do complexo. Como naturalmente, o sal do arsenato encontra-se ionizado em meio aquoso, a equação 6 descreve a reação iônica para uma melhor compreensão do efeito do pH. [70]



De acordo com o princípio de Le Chatelier, quando se aumenta o pH tem-se o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de favorecer os reagentes, comprometendo assim a formação do complexo. Com isso, tem-se também o surgimento das demais espécies, das quais iriam promover a formação de um complexo iônico como produto final, impossibilitado de ser extraído por ponto nuvem. Enquanto

ocorre a desprotonação com o aumento do pH, a fração da espécie  $\text{H}_3\text{AsO}_4$  vai diminuindo gradativamente, por essa razão tem-se a diminuição contínua do sinal analítico até pH 4,5.

### 5.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

Assim como o pH é importante para a formação do complexo, para o sucesso do procedimento de extração por ponto nuvem, é muito importante garantir que a concentração do agente complexante seja suficiente, contando também com a ação conjunta do agente redutor para que nesse caso, ocorra a formação quantitativa do complexo reduzido. É importante assegurar também a eficiência da pré-concentração com um volume de fase rica favorável, que aliada com a vantagem de poder induzir o ponto nuvem em condições mais simples, torna-se uma poderosa ferramenta altamente sensível e econômica que pode ser aplicada em rotina nos laboratórios. Para isso, foi feita a otimização das concentrações do agente complexante molibdato, do redutor do complexo ácido ascórbico, do surfactante Triton X-114 e do eletrólito NaCl.

Para tanto, foi escolhido o surfactante Triton X-114 como meio extrator, uma vez que apresenta baixa temperatura de ponto nuvem, baixo custo, facilidade de manipulação, sendo extensamente empregado em vários sistemas analíticos com a finalidade de melhorar a sensibilidade e a seletividade, como por exemplo a extração e a pré-concentração de íons metálicos. O estudo da concentração do surfactante é necessário porque este precisa estar acima da concentração micelar crítica (CMC) e em quantidade suficiente para que ocorra uma extração quantitativa do complexo formado. Geralmente, os procedimentos de extração que empregam Triton X-114 requerem uma etapa de aquecimento para atingir o ponto nuvem, que é conduzido em banho maria ou em uma chapa de aquecimento.

O ponto nuvem de soluções micelares pode ser alterado pela adição de sais, álcoois, outros surfactantes de caráter iônico bem como algumas substâncias orgânicas ou inorgânicas que provoquem o aumento ou a diminuição da solubilidade da fase micelar em água. Sabe-se por exemplo, que a adição de certos eletrólitos aumentam ou diminuem o ponto nuvem dos surfactantes, principalmente se tratando dos surfactantes não iônicos como o Triton X-114. Esses efeitos, conhecidos respectivamente como “salting-in” e “salting-out” podem ser usados para estimular a indução do ponto nuvem

em temperatura ambiente, podendo eliminar a etapa de aquecimento tornando o procedimento ainda mais simples.

ULUSOY e colaboradores (2011) investigaram o efeito da força iônica sobre a extração de arsênio com a adição dos sais NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e detecção por geração de hidretos em fluxo contínuo após extração por ponto nuvem. Foi verificado melhores resultados com NaCl 0,24% m/v em meio de Triton X-114 0,03% v/v. [71]

NASCENTES e ARRUDA (2003) empregaram um meio micelar misto de Triton X-100 e dodecilsulfato de sódio (SDS) para separar e pré-concentrar cobalto em amostras de medicamentos e determinação por FAAS. Eles estudaram a composição do meio micelar bem como a influência do NaCl e do HCl sobre o ponto nuvem, observando que os ambientes micelares mistos apresentam propriedades diferentes das soluções puras dos surfactantes que os formam em relação ao ponto nuvem. [72]

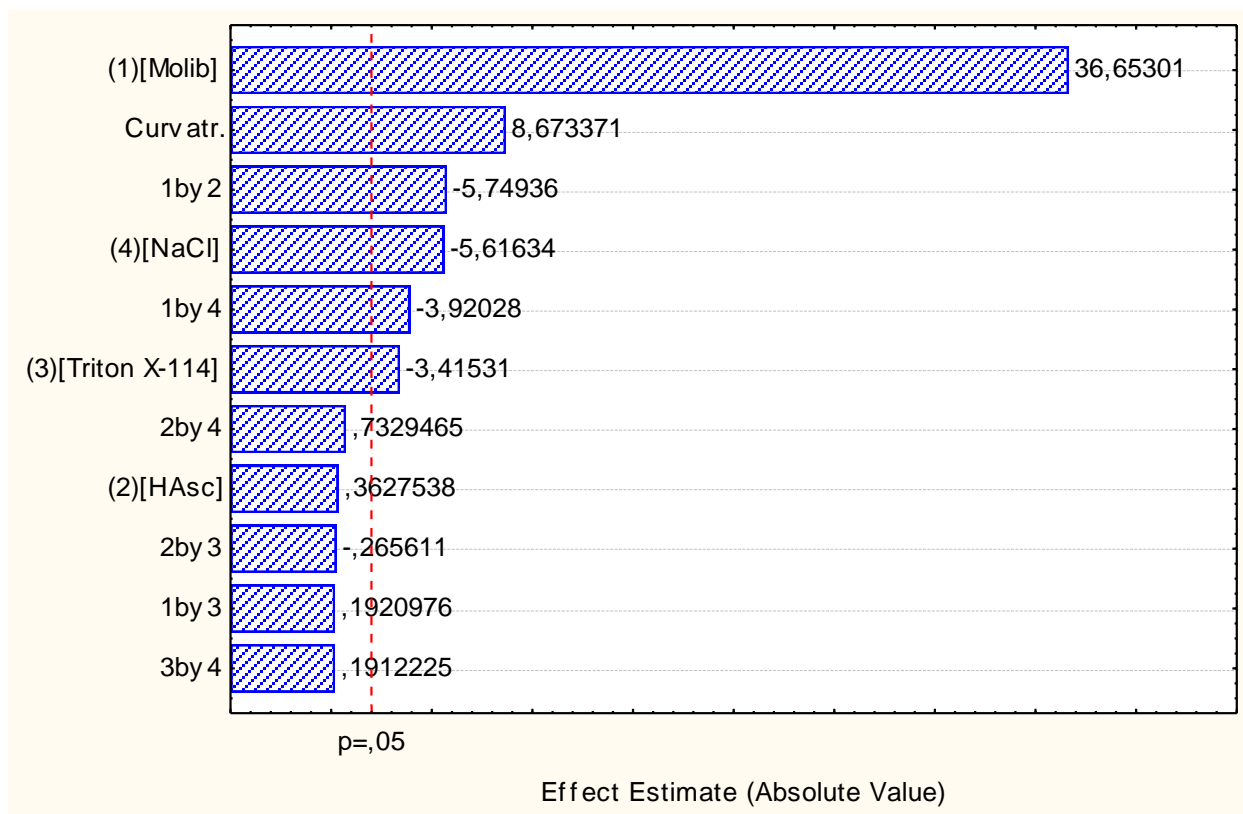
Com relação ao método do azul de molibdato, há indícios na literatura [63] de que o complexo reduzido pode apresentar maior caráter hidrofóbico, contribuindo para o favorecimento da extração por ponto nuvem. Logo, a concentração do agente redutor ácido ascórbico também foi estudada, uma vez que pode levar a um aumento do coeficiente de partição do complexo, obtendo assim altos fatores de pré-concentração.

Com base no que foi exposto acima, avaliando as melhores condições a serem empregadas na extração de As(V) por ponto nuvem, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> completo em função das variáveis citadas anteriormente, dos quais os resultados são apresentados na TABELA 5.4. Para avaliar o grau de significância, tais resultados foram tratados mediante ANOVA admitindo-se um nível de confiança de 95%.

**TABELA 5.4** Resultados do planejamento fatorial  $2^4$  completo para extração de As(V) por ponto nuvem ( $n = 3$ ).

Experimento	[Molib]	[HAsc]	[Triton X-114]	[NaCl]	Absorbância
	(mmol L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )	(% mv <sup>-1</sup> )	(% mv <sup>-1</sup> )	Integrada Média
1	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)	<b>0,1008</b>
2	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)	<b>0,5590</b>
3	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)	<b>0,1432</b>
4	3,000 (1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,024 (-1)	<b>0,5241</b>
5	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,024 (-1)	<b>0,0901</b>
6	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,024 (-1)	<b>0,5156</b>
7	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,024 (-1)	<b>0,1516</b>
8	3,000 (1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,024 (-1)	<b>0,4324</b>
9	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,120 (1)	<b>0,0794</b>
10	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,060 (-1)	0,120 (1)	<b>0,4654</b>
11	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,120 (1)	<b>0,1987</b>
12	3,000 (1)	2,000 (1)	0,060 (-1)	0,120 (1)	<b>0,3624</b>
13	0,405 (-1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,120 (1)	<b>0,0667</b>
14	3,000 (1)	0,250 (-1)	0,120 (1)	0,120 (1)	<b>0,4122</b>
15	0,405 (-1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,120 (1)	<b>0,0763</b>
16	3,000 (1)	2,000 (1)	0,120 (1)	0,120 (1)	<b>0,4279</b>
17 (P.C.)	1,700 (0)	1,120 (0)	0,090 (0)	0,072 (0)	<b>0,4581</b>

Diante das respostas obtidas, foi construído o gráfico de Pareto mostrado na FIGURA 5.7.



**FIGURA 5.7** Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial  $2^4$  completo para o sistema As(V)-CPE-GF AAS.

A concentração de molibdato foi a variável que apresentou maior efeito significativo sobre a extração de As(V), indicando que melhores resultados são obtidos com a maior concentração do agente complexante. Essa informação está de acordo com a necessidade de uma concentração suficiente do complexante para uma formação quantitativa do complexo. É importante ressaltar ainda que a concentração do complexante respeite a razão estequiométrica da reação, evitando que essa quantidade não esteja em grande excesso, uma vez que os ligantes molibdato que não se ligarem ao As(V) poderão complexar outros íons, como os íons fosfato, que são interferentes desta reação e assim competir com o complexo arseno-molibdato durante a extração.

O Gráfico de Pareto mostra mais uma vez a viabilidade da técnica de otimização multivariada pela ocorrência de interações significativas, que devem ser levadas em consideração caso apresente efeito de maior magnitude do que os efeitos principais das variáveis separadas. É o que acontece com a interação entre o complexante molibdato e o ácido ascórbico. A concentração do redutor ácido ascórbico isoladamente não apresentou efeito significativo, logo a sua ação não representa uma contribuição

relevante para a extração. Entretanto sua relação com os íons molibdato mostra uma forte influência com efeito negativo, mostrando que na verdade menores concentrações do agente redutor podem ser mais favoráveis para o método.

Utilizou-se NaCl como eletrólito a fim de induzir o ponto nuvem sem a necessidade de aquecimento. Quando se adiciona NaCl, tem-se o efeito dos íons cloreto por meio do fenômeno “salting-out” que promove a desidratação das cadeias hidrocarbônicas do surfactante, e conseqüentemente maior favorecimento da interação micela-micela, diminuindo a temperatura do ponto nuvem. Conforme mostra o gráfico de Pareto, esta variável também foi significativa, indicando que a força iônica do meio também exerce influência sobre a extração de As(V), e que esta é melhor em menor concentração do eletrólito. Altas concentrações de NaCl podem provocar alterações na carga superficial das micelas normais desestabilizando o seu arranjo auto-organizacional comprometendo a extração.

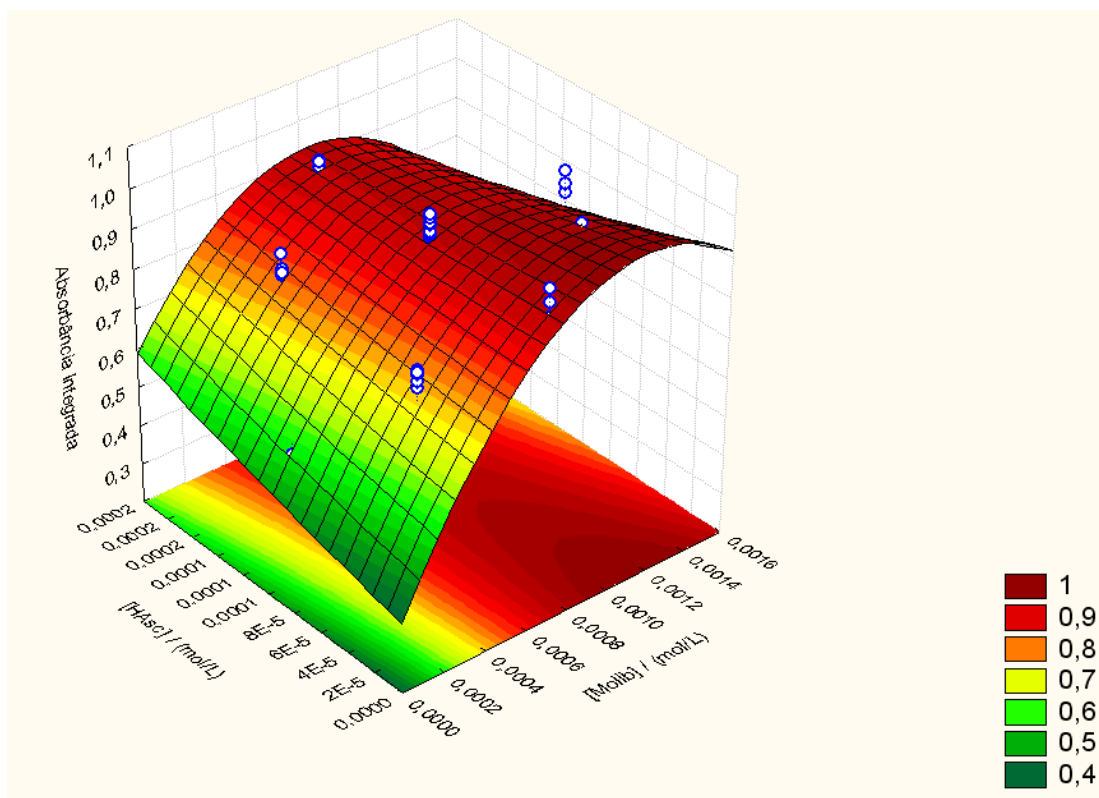
A concentração do surfactante Triton X-114 foi a variável que apresentou menor efeito significativo e pode ser estudado isoladamente uma vez que sua interação com as demais variáveis não foram significativas. O efeito negativo representa o favorecimento da extração em menor concentração do surfactante, o que está em concordância com o fato de que a concentração do surfactante é diretamente proporcional ao volume de fase rica formada. Em altas concentrações de surfactante, ocorre o decréscimo de sinal, uma vez que há também o aumento do volume da fase rica fazendo com o que o complexo de As(V) esteja distribuído em um volume maior, resultando conseqüentemente na diminuição do fator de pré-concentração. Apesar do gráfico de Pareto sugerir menores concentrações do Triton X-114, optou-se por manter fixo a sua concentração em 0,06%  $\text{mv}^{-1}$  para os próximos experimentos, uma vez que empregando concentrações ainda mais baixas do surfactante, tem-se o risco de não formar uma fase rica com um volume satisfatório para promover a extração.

Logo para a otimização completa das concentrações do complexante molibdato, do agente redutor ácido ascórbico e do eletrólito NaCl, estes foram levados para serem exploradas no planejamento composto  $2^3$  com ponto central (CCD) por meio da metodologia da superfície de resposta (RSM). Os resultados obtidos com o CCD estão apresentados na TABELA 5.5.

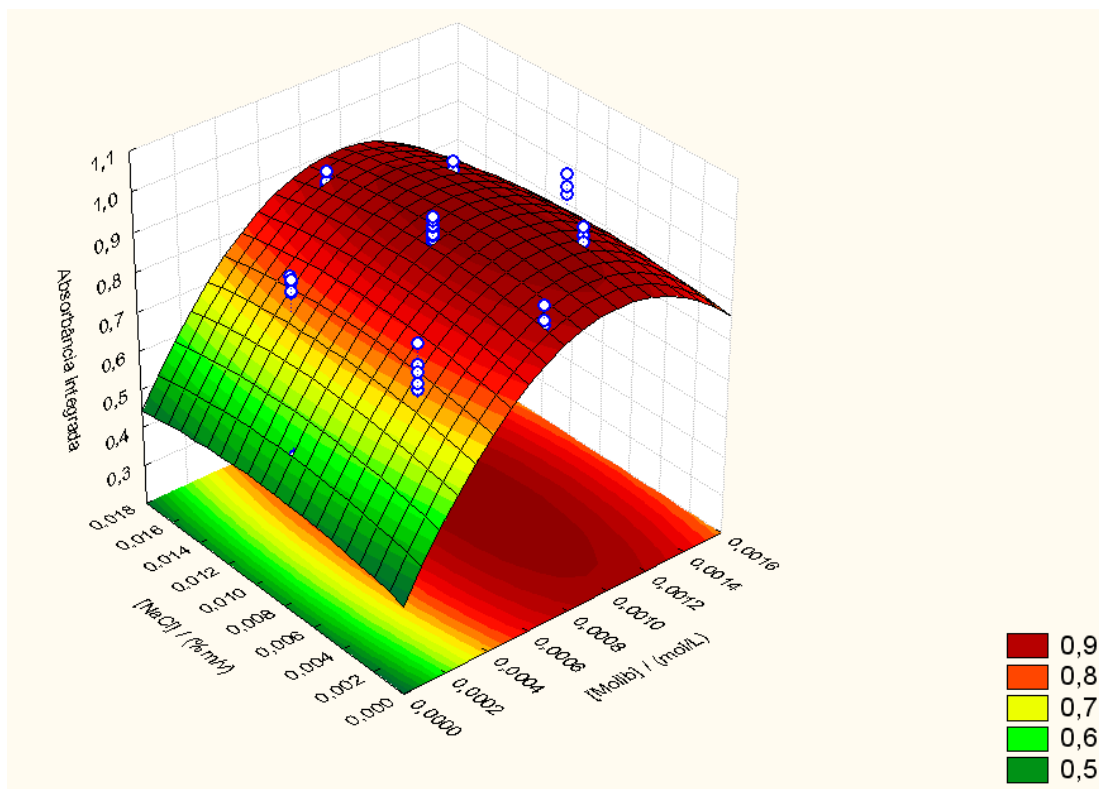
**TABELA 5.5** Resultados do planejamento composto  $2^3$  com ponto central para otimização da extração de As(V) por ponto nuvem ( $n = 3$ ).

<b>Experimento</b>	<b>[Molib] (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[HAsc] (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[NaCl] (% mv<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbância Integrada Média</b>
1	0,4000 (-1)	0,0500 (-1)	0,0045 (-1)	<b>0,7662</b>
2	0,4000 (-1)	0,0500 (-1)	0,0130 (1)	<b>0,7814</b>
3	0,4000 (-1)	0,1500 (1)	0,0045 (-1)	<b>0,8242</b>
4	0,4000 (-1)	0,1500 (1)	0,0130 (1)	<b>0,8123</b>
5	1,2000 (1)	0,0500 (-1)	0,0045 (-1)	<b>0,9464</b>
6	1,2000 (1)	0,0500 (-1)	0,0130 (1)	<b>0,9189</b>
7	1,2000 (1)	0,1500 (1)	0,0045 (-1)	<b>0,8660</b>
8	1,2000 (1)	0,1500 (1)	0,0130 (1)	<b>0,8582</b>
9	0,1300 (-1,68)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,5236</b>
10	1,5000 (1,68)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9096</b>
11	0,8000 (0)	0,0160 (-1,68)	0,0090 (0)	<b>0,9369</b>
12	0,8000 (0)	0,1800 (1,68)	0,0090 (0)	<b>0,9291</b>
13	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0018 (-1,68)	<b>0,8975</b>
14	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0160 (1,68)	<b>0,9045</b>
15 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9154</b>
16 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9260</b>
17 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9278</b>
18 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9300</b>
19 (P.C.)	0,8000 (0)	0,1000 (0)	0,0090 (0)	<b>0,9418</b>

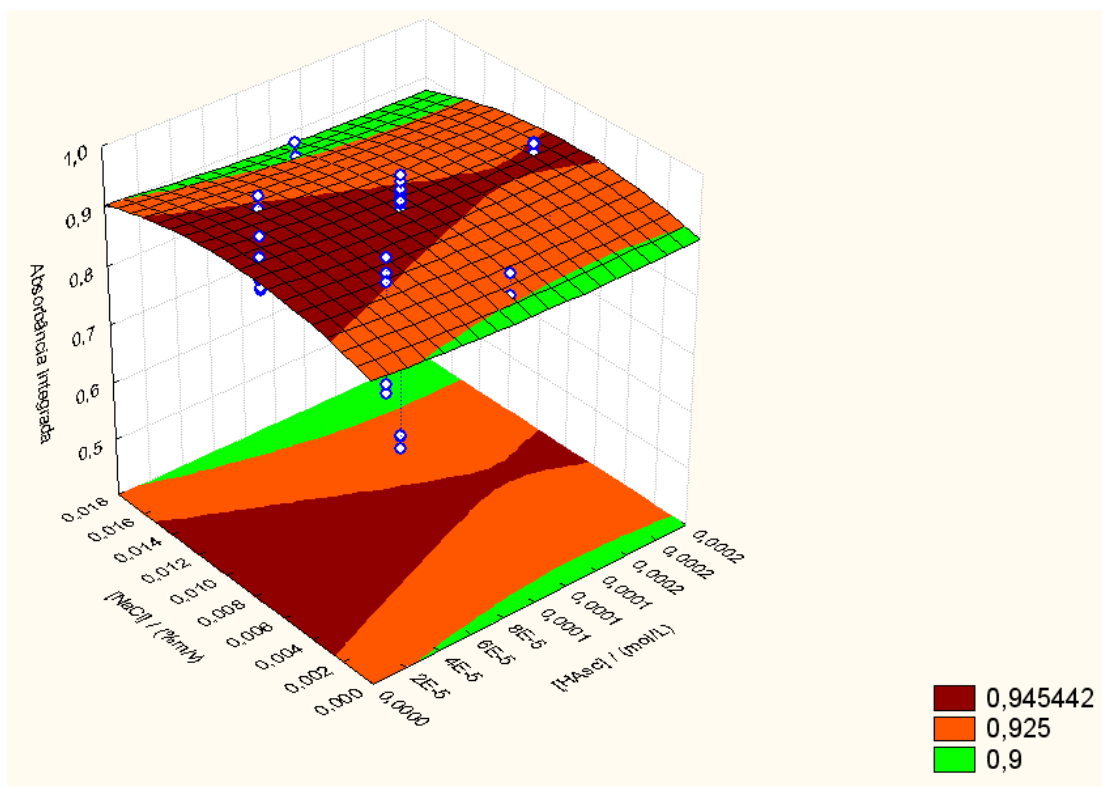
As superfícies de respostas obtidas são apresentadas nas FIGURAS 5.8, 5.9 e 5.10:



**FIGURA 5.8** Superfície de resposta obtido pelo CCD para [Molib] x [HAsc] x Abs. Integrada, mantendo [NaCl] fixo em  $0,008\% \text{ mv}^{-1}$ .



**FIGURA 5.9** Superfície de resposta obtido pelo CCD para [Molib] x [NaCl] x Abs. Integrada, mantendo [HAsc] fixo em  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ .



**FIGURA 5.10** Superfície de resposta obtido pelo CCD para [HAsc] x [NaCl] x Abs. Integrada, mantendo [HAsc] fixo em 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, mantendo [Molib] fixo em 0,85 mmol L<sup>-1</sup>.

As funções polinomiais que descrevem respectivamente as superfícies de repostas apresentadas nas FIGURAS 5.8, 5.9 e 5.10 são mostradas nas equações 7, 8 e 9:

$$\begin{aligned} \text{Abs} = & 0,324 + 1099,3854 [\text{Molib}] - 465978,6906 [\text{Molib}]^2 + 932,2159 [\text{Hasc}] + \\ & 788016,3562 [\text{Hasc}]^2 - 1437708,3333 [\text{Molib}][\text{Hasc}] - (1919,5087)(0,0089)[\text{Molib}] - \\ & (4002,8472)(0,0089)[\text{Hasc}] + 0,053936012 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\begin{aligned} \text{Abs} = & 0,3236 + 1099,3854 [\text{Molib}] - 465978,6906 [\text{Molib}]^2 + 10,5847 [\text{NaCl}] - \\ & 508,2762 [\text{NaCl}]^2 - (1437708,3333)(0,0001)[\text{Molib}] - 1919,5087[\text{Molib}][\text{NaCl}] - \\ & (4002,8472)(0,0001)[\text{NaCl}] + 0,101101757 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\begin{aligned} \text{Abs} = & 0,3236 + 932,2160 [\text{HAsc}] + 788016,3562 [\text{HAsc}]^2 + 10,5847 [\text{NaCl}] - \\ & 508,2762 [\text{NaCl}]^2 - (1437708,3333)(0,0008)[\text{HAsc}] - (1919,5087)(0,0008)[\text{NaCl}] - \\ & 4002,8472[\text{HAsc}][\text{NaCl}] + 0,581281987 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 9})$$

As três variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos concordantes com os efeitos apresentadas no planejamento fatorial, sendo que a concentração do complexante molibdato apresentou efeito substancialmente maior quando comparada as outras duas variáveis, entretanto as interações [Molib]x[HAsc] e [Molib]x[NaCl] foram preponderantes para o alcance das condições ótimas. A interação entre [HAsc]x[NaCl] não representou variações significativas na construção do modelo empírico, mostrando na verdade que [HAsc] execerce mínima influência na eficiência de extração.

O modelo de regressão quadrática apresentou bom ajuste para a superfície de resposta com um porcentagem explicada de 92%. Aplicando-se o critério de Lagrange, foi verificado que o modelo estatístico apresentou um ponto crítico, de onde se têm a maximização do sinal analítico. Assim, as melhores condições experimentais para extração de As(V) por ponto nuvem, estão apresentadas na TABELA 5.6.

**TABELA 5.6** Condições otimizadas para extração de As(V) por ponto nuvem.

Variável	Valor otimizado
[Molib] (mmol L <sup>-1</sup> )	0,850
[HAsc] (mmol L <sup>-1</sup> )	0,100
[Triton X-114] (% mv <sup>-1</sup> )	0,060
[NaCl] (% mv <sup>-1</sup> )	0,008

### 5.3 - ESTUDO DE INTERFERENTES

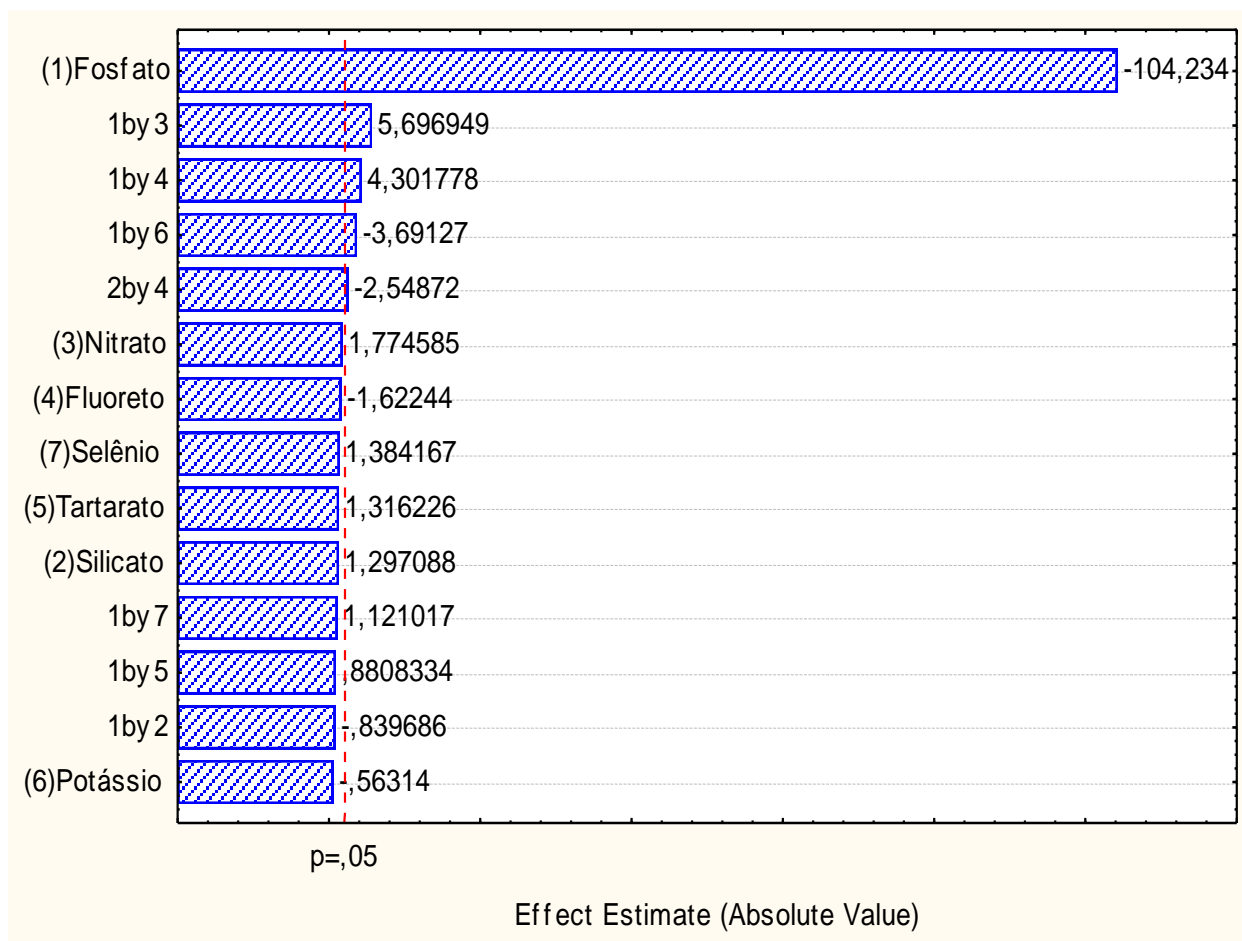
O estudo do efeito dos íons concomitantes fosfato, silicato, nitrato, fluoreto, tartarato, potássio e selênio foi avaliado para verificar a seletividade do método proposto na presença de potenciais interferentes sobre a extração de As(V) por ponto nuvem e detecção por GFAAS sob as condições otimizadas.

O estudo de interferentes compreendeu a presença múltipla de íons concomitantes, realizando um rastreamento multivariado com base no planejamento fatorial fracionário 2<sup>7-3</sup> de resolução IV, resultando num total de 16 experimentos. A matriz do planejamento fatorial com os respostas expressas em absorbância integrada é apresentada na TABELA 5.7.

**TABELA 5.7** Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  de resolução IV para o estudo de interferentes ( $n = 3$ ).

<b>Exp.</b>	<b>Fosfato (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Silicato (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Nitrato (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Fluoreto (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Tartarato (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Potássio (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Selênio (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Abs. Média</b>
1	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	<b>1,2194</b>
2	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	<b>0,2728</b>
3	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	<b>1,2741</b>
4	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	<b>0,2575</b>
5	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	<b>1,2185</b>
6	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	<b>0,2575</b>
7	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	<b>1,2112</b>
8	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	<b>0,3569</b>
9	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	<b>1,2024</b>
10	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	<b>0,2742</b>
11	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	<b>1,1925</b>
12	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	<b>0,2568</b>
13	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	<b>1,1425</b>
14	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	<b>0,3790</b>
15	0,0 (-1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	5000,0 (1)	0,0 (-1)	<b>1,1635</b>
16	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	5000,0 (1)	<b>0,3456</b>

A significância dos efeitos foi verificada por meio da ANOVA ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ). Os efeitos dos íons concomitantes foram avaliados pelo gráfico de Pareto, de onde se pode observar que a presença de íons fosfato representa um forte interferência sobre o método e que a presença dos demais íons não influenciam significativamente sobre o mesmo, conforme mostra a FIGURA 5.11.



**FIGURA 5.11** Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  de resolução IV para o estudo do efeito de íons interferentes sobre as condições otimizadas de extração e detecção.

A interferência negativa do fosfato pode ser atribuída pela competição com o agente complexante molibdato. Essa interferência já era esperada uma vez que a reação do azul de molibdato também é empregada oficialmente na determinação espectrofotométrica de (orto)fosfato. Entretanto a interferência apresentada pelo fosfato não chega a comprometer drasticamente a extração de As (V), uma vez que o teor de tais íons concomitantes nas amostras reais são bem menores do que os níveis aqui estudados, que considera a presença do interferente numa concentração 500 vezes maior do que a concentração do analito.

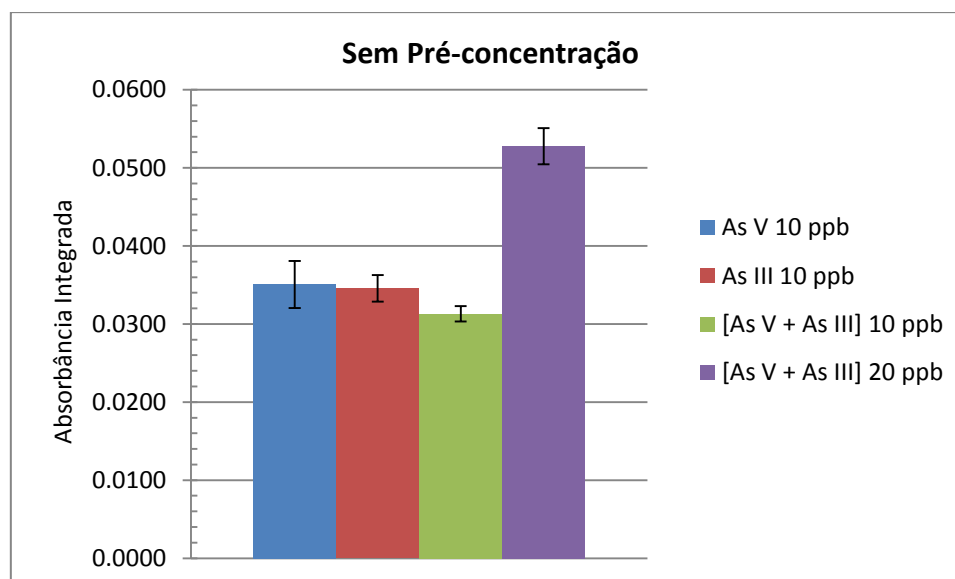
O gráfico de Pareto também aponta para interações significativas, implicando na importância da consideração das circunstâncias reais da composição da amostra frente ao analito, que seriam desprezadas em um estudo de um determinado interferente isolado dos demais. Foi observado que a presença dos íons nitrato e fluoreto, que

atuando juntos com o interferente, conseguem minimizar a interferência do fosfato mesmo que de forma sutil.

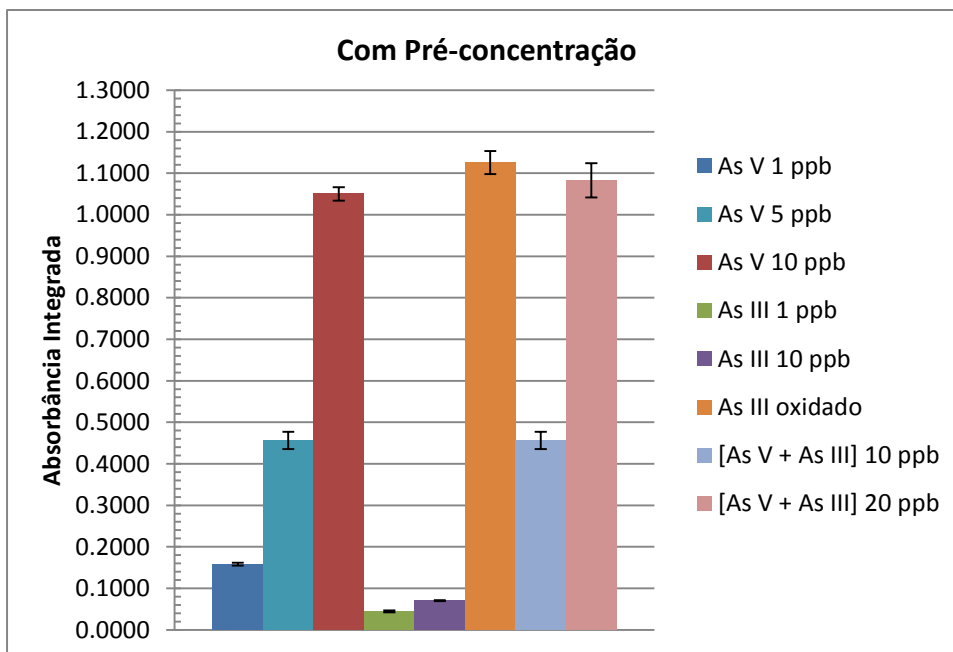
Uma outra possibilidade que pode explicar a ocorrência de interferências positivas no sinal analítico, é decorrente de numerosas vias de dissociação e associação responsáveis pela atomização do elemento de interesse, enquanto a depreciação do sinal também pode ser explicada na possibilidade de formação de novos compostos termicamente estáveis que acarretam na diminuição do sinal de resposta [73].

#### 5.4 - ESTUDO DA SELETIVIDADE DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM PARA ESPECIAÇÃO DE As.

Esse estudo foi realizado na presença de ambas as formas inorgânicas As (III) e As (V), submetidas separadamente e simultaneamente ao procedimento de extração por ponto nuvem. Foram levadas em consideração, as respostas obtidas sem e com a pré-concentração e extração do analito sob diversas circunstâncias analíticas. Os resultados desses experimentos são apresentados respectivamente pelas FIGURAS 5.12 e 5.13 mostradas a seguir:



**FIGURA 5.12** Resultados obtidos por análise direta em GF AAS, sem o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem ( $n = 3$ ).



**FIGURA 5.13** Resultados obtidos com a extração e pré-concentração por ponto nuvem para verificação da seletividade do método proposto ( $n = 3$ ).

A FIGURA 5.12 mostra que a análise direta em GF AAS não é capaz de discriminar as espécies inorgânicas de arsênio quanto à sua forma de oxidação, o que já era esperado quando se emprega essa técnica de detecção. Logo, para finalidades de especiação, torna-se necessário uma etapa de extração seletiva de das espécies antes da etapa de detecção por GF AAS, o que foi conseguida por meio da metodologia proposta.

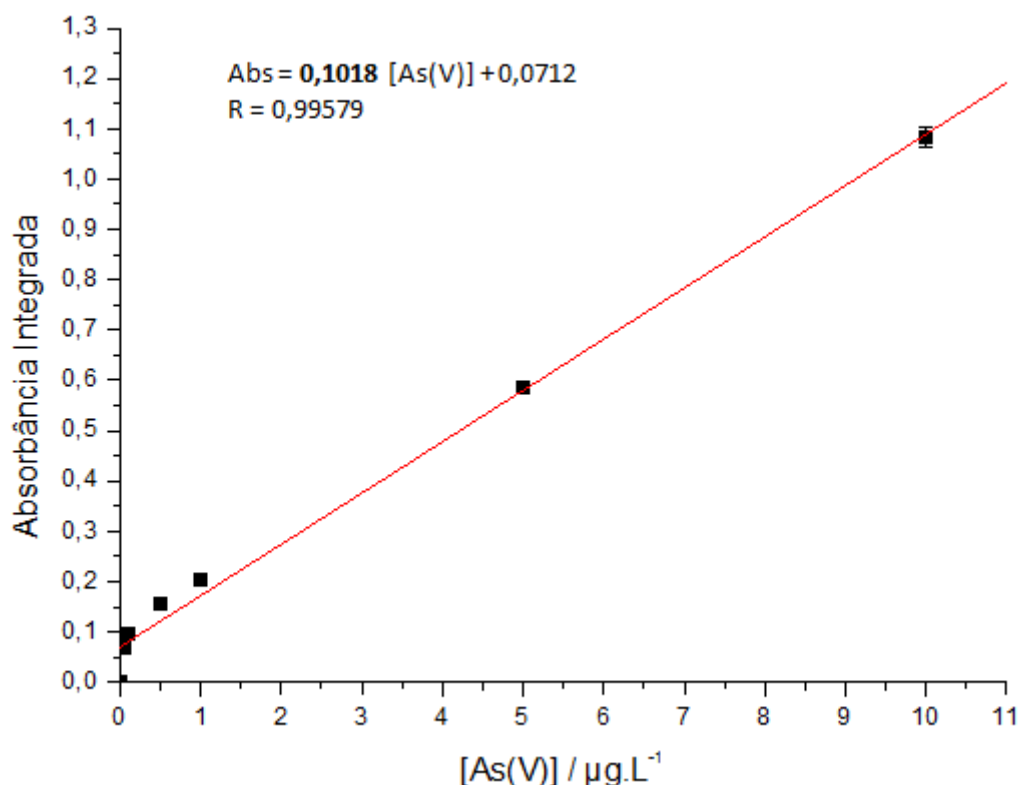
Conforme mostra a FIGURA 5.13, o complexo de As(V)-molibdato é formado e eficientemente extraído por meio da extração por ponto nuvem, com sensibilidade satisfatória e bastante aprimorada em relação à análise direta. A espécie As (III) entretanto somente pode ser determinada mediante uma etapa prévia de oxidação com  $\text{KMnO}_4$  para que seja quantitativamente convertido para a forma pentavalente, podendo ser extraído. Sem essa etapa de oxidação, As (III) não é eficientemente extraído sob as condições otimizadas, com um valor de absorbância integrada correspondente à apenas 6,7% do sinal obtido com As(V)  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos confirmam a seletividade do método proposto com base na reação do azul de molibdato, específica para As (V). Esta hipótese pode ser reforçada em comparação com a extração simultânea de ambas as espécies numa concentração total de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , onde somente 50% desse total é detectado, da qual é

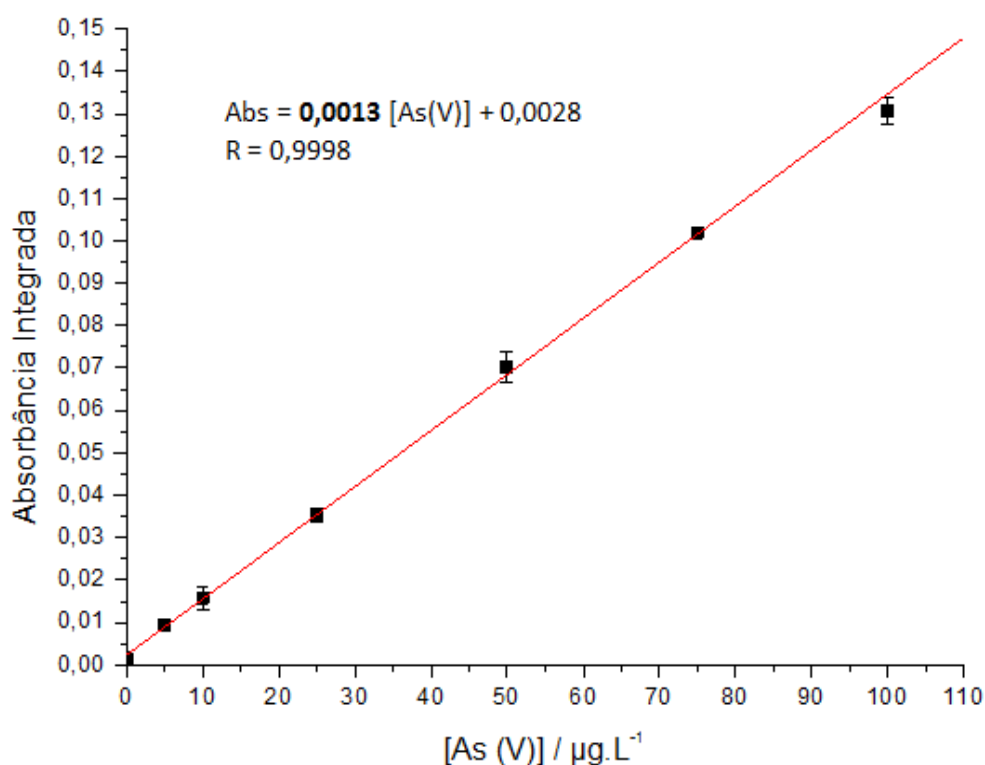
referente ao arsenato extraído, tornando essa metodologia uma ferramenta com potencial promissor para especiação de arsênio inorgânico.

### 5.5 - FIGURAS DE MÉRITO

A eficiência da pré-concentração foi avaliada por meio do fator de enriquecimento (FE), sendo determinado através da construção de uma curva analítica de calibração obtida com As(V) na faixa de 0,05 – 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  submetida ao procedimento de extração por ponto nuvem, e uma outra compreendendo uma faixa de 5,0 – 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  obtida com a leitura direta no GF AAS, sem o procedimento de extração e pré-concentração, utilizando a função de auto-diluição do padrão (auto-mix) do amostrador automático do equipamento. As FIGURAS 5.14 e 5.15 mostram respectivamente as curvas de calibração obtidas



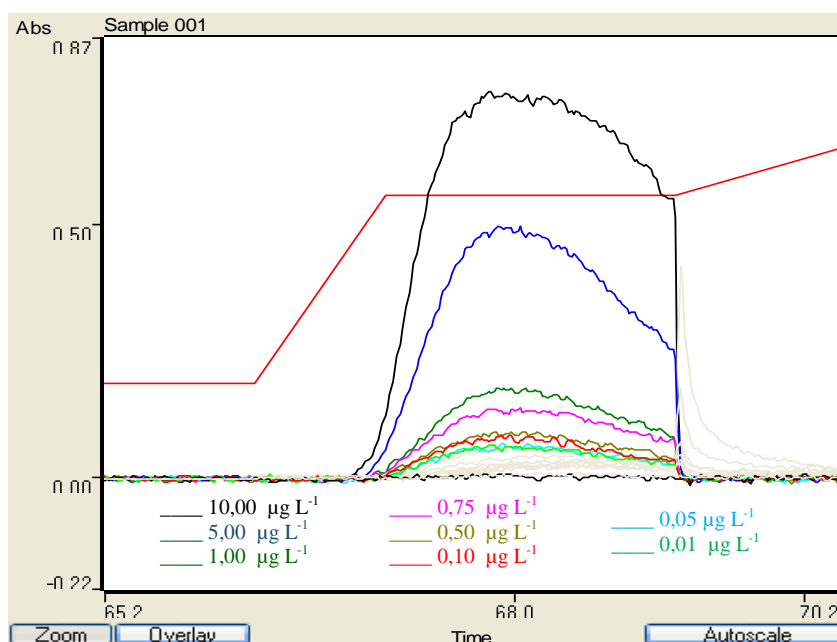
**FIGURA 5.14** Curva de calibração com As(V) obtida com o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem.



**FIGURA 5.15** Curva de calibração para As(V) obtida sem o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem.

As inclinações das curvas de calibração com e sem o procedimento de extração e pré-concentração foram respectivamente 0,1018 e 0,0013, dos quais resultaram num excelente fator de enriquecimento, com aumento de 78,3 vezes na sensibilidade. Esse ganho adicional de sensibilidade na técnica de GF AAS sob as condições ótimas experimentais, refletiram na obtenção de valores muito baixos nos limites de detecção e quantificação, dos quais foram respectivamente 0,0099 µg L<sup>-1</sup> e 0,0331 µg L<sup>-1</sup>. Tais valores permitem que o método possa ser aplicado satisfatoriamente, com garantia analítica, na determinação de níveis muito baixos de arsênio nas amostras a serem analisadas.

Em termos qualitativos, a FIGURA 5.16 mostra os sinais transientes para As(V) obtidos em cada ponto da calibração, sobre as condições validadas desta metodologia, em que se pode observar que a região do limite de quantificação apresenta um sinal significativamente distinguível do ruído. Logo essa região apresenta utilidade para expressar informações quantitativas com uma boa segurança analítica e precisão, assegurando a credibilidade dos resultados expressos nesse intervalo.



**FIGURA 5.16** Sinais transientes para As(V) obtidas dentro da faixa de trabalho sob as condições validadas.

A curva de calibração obtida pela metodologia desenvolvida cobriu uma ampla faixa linear de trabalho, com coeficiente de correlação maior do que 0,99. A TABELA 5.8 apresenta as figuras de mérito para a metodologia proposta e validada. A seletividade garantida, a sensibilidade e a precisão demonstram a viabilidade deste método na combinação da extração por ponto nuvem com a detecção por GF AAS para As(V).

**TABELA 5.8** Figuras de mérito obtidas para o método As(V)-CPE-GF AAS otimizado.

Parâmetro	Valor obtido
Faixa Linear de Trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,03 – 10,0
Equação de Calibração	$\text{Abs} = 0,1018 [\text{As(V)}] + 0,0712$
Coeficiente de Correlação	0,99579
Coeficiente de Variação intra-ensaio	2,5
D.P.R (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; $n = 10$ ) (%)	
Coeficiente de Variação inter-ensaio	2,9
D.P.R (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; $n = 5$ ) (%)	
Limite de Detecção (LD) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,0099
Limite de Quantificação (LQ) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,0331
Fator de Enriquecimento (FE)	78,3

## 5.6 – EXATIDÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS REAIS

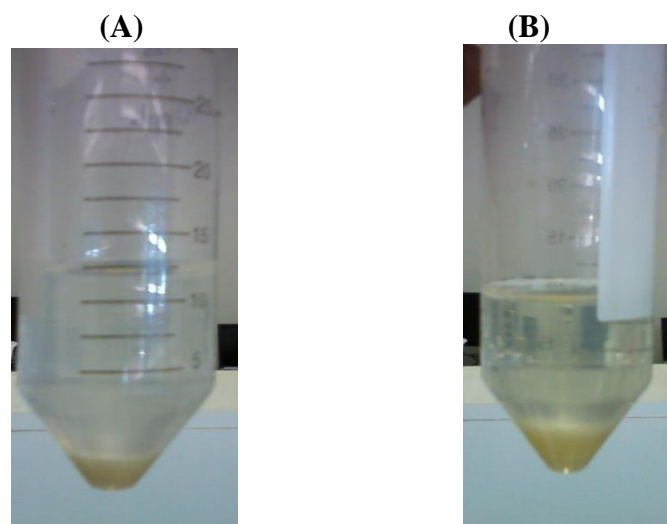
O método desenvolvido e validado foi aplicado na determinação de As(V) e arsênio total nas amostras de arroz processadas sob diferentes beneficiamentos de consumo: Arroz branco, Arroz Integral e Arroz Parboilizado.

O procedimento de preparo das amostras digeridas mediante extração assistida por ultra-som para finalidades de especificação, foi realizado segundo descrito pelos itens 4.8 e 4.9. Foi utilizado dois aparelhos de banhos de ultra-som paralelamente com intuito de poupar tempo da sonicação das réplicas das amostras. Para tanto, foi feito um mapeamento da parte interna dos banhos de ultra-som por meio do teste do papel alumínio para delimitação da região de maior incidência das ondas ultra-sônicas, e assim focalizar uma posição específica e favorável para a amostra dentro do banho. As FIGURAS 5.17 A e 5.18 B ilustram o posicionamento.



**FIGURA 5.17** Focalização do posicionamento das amostras nos banhos de ultra-som por meio do teste do papel alumínio.

A FIGURA 5.18 ilustra uma amostra em meio extrator de  $\text{HNO}_3$  para promover o ataque ácido, antes e após ser submetida à etapa de extração assistida por ultra-som. Essa etapa visa liberar quantitativamente as espécies de arsênio da matriz, para então serem seletivamente pré-concentradas e detectadas segundo a metodologia aqui desenvolvida. Para avaliação da exatidão do método proposto, foram realizados testes de adição e recuperação de As(V) em dois níveis de fortificação para todas as amostras de arroz. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 5.9.



**FIGURA 5.18** (A) Amostra de arroz em meio extrator de ácido nítrico e (B) após ser submetida à extração assistida por ultra-som.

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 5.9, os valores de recuperação obtidos variaram desde 90,8% até 113,1%, indicando que a metodologia quando aplicada nas amostras de arroz não apresentou problemas relacionados ao efeito de matriz uma, vez que os valores se enquadraram dentro da faixa aceitável de 80 a 120% de acordo com AOAC. [59]

Como o arroz se enquadra dentro da classe alimentícia de cereais, o nível máximo de arsênio decretado pelas regulamentações (ANVISA) é de até  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Nas amostras de arroz analisadas, o teor de arsênio total encontrado em função do beneficiamento variou de  $0,0125 \pm 0,0023 \mu\text{g g}^{-1}$  para o arroz branco,  $0,1893 \pm 0,0063 \mu\text{g g}^{-1}$  para o integral e  $0,0640 \pm 0,0022 \mu\text{g g}^{-1}$  para o arroz parboilizado. Logo, nenhuma das amostras de arroz obtidas por meio do processamento regional de cultivo não apresentou teores de arsênio total acima do limite máximo tolerado. O método desenvolvido apresentou limite de quantificação bem abaixo desse valor regulamentado ( $\approx 0,0125 \mu\text{g g}^{-1}$ ) comprovando a sua aplicabilidade na determinação de arsenato em amostras de arroz, além de uma possível aplicação em amostras que apresentem matrizes semelhantes.

A TABELA 5.10 traça uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com a metodologia aqui desenvolvida com os das publicações reportadas na literatura. Os dados do presente método apresentam sensibilidade e precisão concordantes ou até melhores em relação aos demais métodos de extração convencionais, com destaque para o excelente fator de concentração alcançado.

**TABELA 5.9** Resultado dos testes de adição e recuperação de As(V) na especiação de arsênio total nas amostras de arroz ( $n = 2$ ).

Amostra	[As (V)] adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	[As (V)] Encontrado <sup>a</sup>		Recuperação <sup>b</sup> (%)	Arsênio Total <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Outras espécies de Arsênio <sup>a</sup> ( $_{sp}\text{As}$ ) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
		$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$			
Arroz Branco	0,0	< LQ	< LQ	-	$0,0125 \pm 0,0023$	$0,0125 \pm 0,0023$
	5,0	$4,9705 \pm 0,0026$	$0,1243 \pm 0,0026$	99,4	$0,2194 \pm 0,0037$	$0,0951 \pm 0,0045$
	10,0	$11,1952 \pm 0,0068$	$0,2799 \pm 0,0068$	111,9	$0,4013 \pm 0,0016$	$0,1214 \pm 0,0069$
Arroz Integral	0,0	$1,7322 \pm 0,0020$	$0,0433 \pm 0,0020$	-	$0,1893 \pm 0,0063$	$0,1460 \pm 0,0066$
	5,0	$6,1117 \pm 0,0074$	$0,1528 \pm 0,0074$	90,8	$0,2128 \pm 0,0070$	$0,0600 \pm 0,0102$
	10,0	$13,2646 \pm 0,0029$	$0,3316 \pm 0,0029$	113,1	$0,4632 \pm 0,0174$	$0,1316 \pm 0,0176$
Arroz Parboilizado	0,0	$2,5016 \pm 0,0130$	$0,0625 \pm 0,0130$	-	$0,0640 \pm 0,0022$	$0,0015 \pm 0,0132$
	5,0	$8,3333 \pm 0,0090$	$0,2083 \pm 0,0090$	111,1	$0,2095 \pm 0,0062$	$0,0012 \pm 0,0109$
	10,0	$12,8520 \pm 0,0160$	$0,3213 \pm 0,0160$	102,8	$0,3316 \pm 0,0093$	$0,0103 \pm 0,0185$

<sup>a</sup> Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 2$ ).

$$\text{\% Recuperação} = \frac{C_{As(V)adicionada}}{C_{As(V)obtida}} \times 100$$

**TABELA 5.10** Comparação do método proposto neste trabalho com os outros métodos aplicados para extração e determinação de arsênio.

<b>Espécies</b>	<b>Agente complexante</b>	<b>Técnica de Detecção</b>	<b>Sistema Experimental</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Fator de Enriquecimento</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Ref.</b>
As (III)	APDC	GF AAS	CPE	0,04	36	3,0	[74]
As (III), As total	APDC	GF AAS	CPE	0,02	40	2,3	[44]
As (III), As(V)	APDC	GF AAS	DLLME	0,036	45	3,1	[75]
As (III)	Br - PADAP	UV-Vis	Espectrofotometria	14,0	Nao definido	5,0	[76]
As (III), As (V)	Sem ligante	FI-HG-MF- AAS	Extração assistida por microondas	2,0	Nao definido	Nao definido	[77]
As (V)	Molibdato	UV-Vis	CPE	1,0	5	1,2	[63]
As (III), As (V)	Molibdato	GF AAS	CPE	0,01	52,5	5,0	[78]
As (III), As (V)	Pyronine B	FAAS	CPE	1,67	120	2,1	[79]
As (III), As (V)	Sem ligante	HG-AAS	Biosorção	0,011	35	7,0	[80]
As (III), As (V)	Sem ligante	ICP-AES	Resina de troca aniônica	0,1	10	5,0	[81]
As(V), As total	Molibdato	GF AAS	CPE	0,009	78,3	2,5	Este Trabalho

## 6. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para extração e pré-concentração de As(V) por ponto nuvem e detecção por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite, As(V)-CPE-GF AAS, apresentou como uma alternativa interessante e eficiente para determinação de As(V) e arsênio total presentes em baixas concentrações em amostras de arroz. O método é simples, de baixo custo minimizando o uso de solventes orgânicos e reduz o consumo de reagentes e amostras. Foi possível atingir a condição ótima de experimentação sem a necessidade de aquecimento, com reduzido número de experimentos, diminuindo tempo, custo e a geração de resíduos.

A utilização de planejamentos experimentais multivariados, como planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta se mostraram como uma ferramenta muito importante para otimização do método, uma vez que forneceu informações essenciais sobre os efeitos que cada variável exerceu sobre a detecção e na pré-concentração por ponto nuvem, principalmente com relação aos efeitos de interação.

O emprego de modificação permanente do tubo atomizador de grafite com irídio resultou na construção de um programa de temperatura eficaz aplicado para amostras tratadas em meio micelar. Os resultados demonstraram viabilidade da extração e pré-concentração por ponto nuvem, extraindo quantitativamente As(V), como uma etapa prévia na detecção, resultado num excelente fator de enriquecimento.

O método apresentou aumento expressivo na sensibilidade com limite de detecção e quantificação suficientes para determinar As(V) em alimentos dentro dos valores normatizados por agências regulamentadoras, com bons valores de precisão e com exatidão aceitável, abrindo possibilidades potenciais bastante promissoras para ser aplicado em outros tipos de amostras com matrizes similares e com finalidades de especiação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] OLIVEIRA, R. R.; Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de As, Cd, Ni e Pb em batata e mandioca produzidas em regiões mineiras empregando Espectroscopia de Absorção Atômica em Forno de Grafite. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química - UFMG **2009**. Dissertação de Mestrado. 67p.
- [2] PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES C. R.; FREIRE, L. A. A; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. *Química Nova*, 5: 1138-1149, **2006**.
- [3] PEREIRA, M. DE G.; ARRUDA, M. A. Z. “Trends in Pre-concentration Procedures for metal Determination using Atomic Spectrometry Techniques” *Microchimical Acta*, 141:115-131, **2003**.
- [4] ALVEZ, V. N. Desenvolvimento de uma metodologia de pré-concentração em fluxo utilizando cascas tratadas de *Moringa oleifera* como bioadsorvente para determinação de Zn(II) em matrizes alcóolicas. Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Química - UFU **2010**. Dissertação de Mestrado, 98p.
- [5] REZENDE, H. C. Pré-concentração por extração em ponto nuvem para determinação de cádmio em amostras de bebidas por Espectroscopia de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico. Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Química - UFU **2010**. Dissertação de Mestrado, 65p.
- [6] BAIG, J. A.; KAZI, T. G.; ARAIN, M. B.; SHAH, A. Q.; KANDROH, G. A.; AFRIDI, H. I.; KHAN, S.; KOLACHI, N. F.; WADHWA, S. K. Inorganic arsenic speciation in groundwater samples using Electrothermal Atomic Spectrometry following selective separation and Cloud Point Extraction. *Analytical Sciences*, 27: 439-445, **2011**.
- [7] BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. Extração por ponto nuvem: Princípios e aplicações em química Analítica. Vitória da Conquista - UESB **2006**, UESB Edições 165p.
- [8] DEPOI, F. Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de metais e metaloides usando pré-concentração no ponto nuvem e ICP OES. Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Química – UFRS **2012**. Tese de Doutorado, 95p.
- [9] BATISTA, B. L. Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz. Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP **2012**. Tese de Doutorado 179p.
- [10] PETROPOLU, M. O.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching / digestion procedure and hydride generation atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 337: 323-327, **1997**.

- [11] MANDAL, B. K.; K. T. SUZUKI. Arsenic round the world: A review. *Talanta*, 58: 201, **2002**.
- [12] HOWARD, A. G.; HUNT, L. E. Coupled Photooxidation-hydride AAS Detector for the HPLC of Arsenic Compound. *Analytica Chemistry*, 65: 2995-2998, **1993**.
- [13] BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry for arsenic speciation using the Fleitmann reaction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8, 229-233, **1993**.
- [14] BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; de la GUARDIA, M. Especificação de Arsênio – Uma Revisão. *Química Nova*, 23: 58-70, **2000**.
- [15] WHO (2010) Exposure to arsenic: A major public health concern. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/print.html>. Acesso em julho de 2011.
- [16] JOHSON, D. L. Bacterial reduction of arsenate in sea water. *Nature*, 240: 44, **1972**.
- [17] ANDERSON, R.K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media. *Analyst*, 111: 1143-1152, **1986**.
- [18] DIONÍSIO, A. G. G.; GONZALES, M. H.; NÓBREGA, J. A.; Determinação de arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. *Química Nova*, 34: 49-52, **2011**.
- [19] SANTOS, L. M. G. Avaliação e otimização de metodologias de determinação de Arsênio total, As(III) e As(V) em amostras de água e alimentos e a relevância dos riscos por ingestão. Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz **2004**. Tese de Doutorado, 119 p.
- [20] QUINÁIA, S. P.; ROLLEMBERG, M. C. E. Selective reduction of Arsenic Species by Hydride Generation – Atomic Absorption Spectrometry Part 1 – Reduction Media. *Journal Brazilian Chemical Society*, 8: 349-356, **1997**.
- [21] WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A.; Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural, Santa Maria*, 38: 1184-192, **2008**.
- [22] ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 849 – 868, **2002**.
- [23] ZHOU, Z. et al. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87: 401-406, **2004**.
- [24] EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Agência de informação EMBRAPA: Arroz. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/Abertura.html>. Acesso em 16 de julho de 2013.

- [25] STORCK, C. R. Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos. Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSM **2004**. Dissertação de Mestrado, 111p.
- [26] ITANI, T.; TAMAKI, M.; ARAI, E.; HORINHO, T. Distribution of amylose, nitrogen, and minerals in rice kernels with various characters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5326-5332, **2002**.
- [27] JULIANO, B.O. Polysaccharides, proteins, and lipids of rice. In: JULIANO, B.O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, **1985**. Cap.3, p.17-57.
- [28] ALAM, M. B.; SATTAR, M. A. Assessment of arsenic contamination in soils and Waters in some areas of Bangladesh. *Water Science and Technology*, 42: 185-192, **2000**.
- [29] RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M. M.; MAZID MIAH, M. A.; TASMIN, A.; Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa L.*): Human exposure through food chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 317-324, **2008**.
- [30] SMITH E.; KEMPSON, I.; JUHASZ, A. L.; WEBER, J.; SKINNER, W. M.; GRÄFE, M. Localization and speciation of arsenic and trace elements in rice tissues. *Chemosphere*, 76: 529-535, **2009**.
- [31] RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M. M.; ARIFUR RAHMAN, M.; MIAH, M. A.M Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa L.*) and distribution in fractions of rice grain. *Chemosphere*, 69: 942-948, **2007**.
- [32] RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; High level inorganic arsenic in rice areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation cooking. *Science of the Total Environment*, 409: 4645-4655, **2011**.
- [33] MA, M.; LE, X.C. Effect of arsenosugar ingestion on urinary speciation. *Clinical Chemistry*, 44: 539-550, **1998**.
- [34] COELHO, L. M. Pré-concentração por “eletrostacking” e por ponto nuvem para determinação de arsênio e cádmio em amostras ambientais e biológicas. Campinas, Departamento de Química Analítica – UNICAMP **2005**. Tese de Doutorado, 76p.
- [35] WELZ, B. Speciation analysis. The future of atomic absorption spectrometry – invited lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13: 413-417, **1998**.
- [36] VASSILEVA, E.; BECKER, A.; BROEKAERT, J. A. C.; Determination of arsenic and selenium species in groundwater and soil extracts by ion chromatography coupled to inductively coupled plasm mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 441: 135-146, **2001**.
- [37] BATISTA, B. L.; SOUZA, J. M. O.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 191: 342-348, **2011**.

- [38] BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARVOSA, F. A fast ultrasound-assisted extraction procedure for trace elements determination in hair samples by ICP-MS for forensic analysis. *Forensic Science International*, 192: 88-93, **2009**.
- [39] WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtos. *Talanta*, 25: 585-589, **1978**.
- [40] BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. *Analytica Chimica Acta*, 677: 108-120, **2010**.
- [41] FANG, Q.; DU, M.; HUIE, C. W. On line incorporation of cloud point extraction to flow injection analysis. *Analytical Chemistry*, 73: 3502, **2001**.
- [42] MATOS, G. D.; REIS, E. B.; COSTA, A. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Speciation of chromium in river water samples contaminated with leather effluents by flame atomic absorption spectrometry after separation / pre-concentration by cloud point extraction. *Microchemical Journal*, 92: 135-139, **2008**.
- [43] REZENDE, H. C.; NASCENTES, C. C.; COELHO, N. M. M. Cloud point extraction for determination of cadmium in soft drinks by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 97: 118-121, **2011**.
- [44] BAIG, J. A.; KAZI, T. G.; SHAH, A. Q.; ARAIN, M. B.; AFRIDI, H. I.; KANDHRO, G. A.; KHAN, S. Optimization of cloud point extraction and solid phase extraction methods for speciation of arsenic in natural water using multivariate technique. *Analytica Chimica Acta*, 651: 57-63, **2009**.
- [45] WELZ B, SPERLING M. Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemanha, **1999**.
- [46] NOBREGA, J. A.; RUST, J.; CALLOWAY, C. P.; JONES, B. T. Use of modifiers with metal atomizers in electrothermal AAS: a short review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59: 1337-1345, **2004**.
- [47] ORTNER, H. M.; BULSKA, E.; Rohr, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUCH, S.; WELZ, B. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry - mechanisms of action (A tutorial review). *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57: 1835-1853, **2002**.
- [48] FROES, R. E. S.; WINDMÖLLER, C. C.; SILVA, J. B. B. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Revista Analytica*, 23: 42-43, **2006**.

- [49] PEREIRA, L. A.; AMORIM, I. G.; SILVA, J. B. B.; Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers. *Talanta*, 64: 395-401, **2004**.
- [50] SILVA, J. B. B.; BORGES, D. L. G.; VEIGA, M. A. M. S.; CURTIS, A. J.; WELZ, B. Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier, *Talanta*, 60: 977-982, **2003**.
- [51] PEREIRA, L. A.; AMORIM, I.; SILVA, J. B. B. Determination of cadmium, chromium and lead in marine sediment slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using permanent modifiers. *Talanta*, 68: 771-775, **2006**.
- [52] VILAR, M.; BARCIELA, J.; GARCIA-MARTIN, S. R.; PENA, M.; HERRERO, C. Comparison of different permanent chemical modifiers for lead determination in Orujo spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71: 1629-1636, **2007**.
- [53] MICHON, J.; DELUCHAT, V.; SHUKRY, R. A.; DAGOT, C.; BOLLINGER, J. Optimization of a GFAAS method for determination of total inorganic arsenic in drinking water. *Talanta*, 71: 479-785, **2007**.
- [54] AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K.; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. *Talanta*, 76: 627-634, **2008**.
- [55] NETO, B. B.; SACARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. São Paulo: Editora da UNICAMP, 401 p. **2002**.
- [56] PEREIRA-FILHO, E.; POPPI, R.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. *Química Nova*, 25: 246-253, **2002**.
- [57] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial. *Química Nova*, 29: 338, **2006**.
- [58] ESCALBEIRA, L. A. Extração e pré-concentração no ponto nuvem para a determinação de metais em águas salinas por Espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado. Niterói, Curso em Pós-graduação em Geociências – UFF **2005**. Dissertação de Mestrado, 101p.
- [59] AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, **1995**, p.984.
- [60] AFNOR, Qualité des eaux, Afnor édition, Paris, **1997**.

- [61] LENOBLE, V.; DELUCHAT, V.; SERPAUD, B.; BOLLINGER J. C. Arsenite oxidation and arsenate determination by the molybdene blue method, *Talanta*, 61: 267-276, **2003**.
- [62] KOZHEVNIKOV, I.V. "Catalysis by heteropoly acids and multicomponent polyoxometalates in liquid-phase reactions". *Chemical Reviews*, 1: 171–198, **1998**.
- [63] KUMAR, K. S.; PANDURANGAPPA M. Trace Level Arsenic Quantification through Cloud Point Extraction: Application to Biological and Environmental Samples. *The ScientificWorld Journal*, 2012: 1-8, **2012**.
- [64] J. D. LOWRY, S. B. LOWRY, Oxidation of Arsenic(III) by aeration and storage, NRMRL Office of Research and Development US EPA, EPA/600/R-01/102, **2002**.
- [65] GIACOMELLI, M. B. O.; LIMA, M. C.; STUPP, V.; JUNIOR, R. M. C.; SILVA, J. B. B.; BARRERA, P. B., Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir+Rh as permanent modifiers or Pd+Mg in solution. *Spectrochimica Acta Part B*, 57: 2151-2157, **2002**.
- [66] CARLETTO, J. S.; ROUX, K. C. P.; MALTEZ, H. F.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Use of 8-hydroxyquinoline-chitosan resin in an automated on-line pre-concentration system for determination of zinc (II) by FAAS. *Journal of Hazardous Materials*, 89-93, **2008**.
- [67] PAULA, J. F. R.; FROES-SILVA, R. E. S.; CIMINELLI, V. S. T. Arsenic determination in complex mining residues by ICP OES after ultrasonic extraction. *Microchemical Journal*, 104: 12-16, **2012**.
- [68] LAUF, G. F.; WAER, M. A. Arsenic removal using potassium permanganate. Proceedings of the Water Quality Technology Conference, ISSN: 0164-0755, p. 1025, **1993**.
- [69] GREENBERG, A. E.; CLESCERL, L. S.; EATON, A. D. Standard Methods: For the Examination of Water and Wastewater, 20 ed, EUA: American Public Health Association (APHA), **1998**.
- [70] VOGEL, A. I. Química Analítica Qualitativa. 5ª ed, Gimeno, A. Mestre Jou, São Paulo, **1981**.
- [71] ULUSOY, H. I.; AKÇAY M.; ULUSOY, S.; GÜRKAN, R. Determination of ultra-trace arsenic species in water samples by hydride generation atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. *Analytica Chimica Acta*, 703: 137-144, **2011**.
- [72] NASCENTES, C.C.; ARRUDA, M.A.Z. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and pre-concentration. *Talanta*, 61: 759-768, **2003**.
- [73] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5ª. ed. Artmed Editoras, S. A. Porto Alegre – RS. **2002**.

[74] A. TANG, G. DING, X. YAN. Cloud point extraction for the determination of As(III) in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 67: 942-946, **2005**.

[75] LIANG, P.; PENG, L.; YAN, P. Speciation of As(III) and As(V) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction separation and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchimica Acta*, 166: 47-52, **2009**.

[76] PEREIRA, S. F. P.; FERREIRA, S. L. C.; OLIVEIRA, G. R.; PALHERA, D. C.; BARROS, B. Spectrophotometric determination of arsenic in soil samples using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-di-ethylaminophenol (Br-PADAP). *Eclética Química*, 33: 23-28, **2008**.

[77] LEHMANN, E. L.; FOSTIER, A. H.; ARRUDA, M. A. Z.; Hydride generation using a metallic atomizer after microwave-assisted extraction for inorganic arsenic speciation in biological samples. *Talanta*, 104: 187-192, **2013**.

[78] SHEMIRANI F.; BAGHDADE, M.; M, RAMEZANI. Preconcentration and determination of ultra trace amounts of arsenic(III) and arsenic(V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 65: 882-887, **2005**.

[79] ULUSOY, H. I.; AKÇAY, M.; GÜRKAN, R.; Development of an inexpensive and sensitive method for the determination of low quantity species in water samples by CPE-FAAS. *Talanta*, 85: 1585-1591, **2011**.

[80] TUZEN, M.; SAYGI, K. O.; KARAMAN, I.; SOYLAK, M. Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 41-46, **2010**.

[81] JITMANEE K., OSHIMA M.; MOTOMIZU S., Speciation of arsenic (III) and arsenic (V) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry coupled with preconcentration system. *Talanta*, 66: 529-533, **2005**.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Bruno Elias dos Santos Costa		
E-mail:	brunoeliassantos@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento: CAPES		Sigla:	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Extração seletiva por ponto nuvem para pré-concentração e especiação de arsênio inorgânico em matriz alimentícia empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite		
Palavras-chave:	Arsênio, Extração por Ponto Nuvem, Arroz, Forno de Grafite		
Título em outra língua:	Selective Extraction by Cloud Point for Preconcentration and Speciation of Inorganic Arsenic in Food using Graphite Furnace Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy		
Palavras-chave em outra língua:	Arsenic, Cloud Point Extraction, Food, ETAAS		
Área de concentração:	Química Analítica		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/07/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Mestrado em Química – PPGQ / CAC / UFG		
Orientador (a):	Luciana Melo Coelho		
E-mail:	lucianacatalao@hotmail.com		
Co-orientador (a):	Profa. Dra. Nivia Maria Melo Coelho (IQ-UFU)		
E-mail:	nmmcoelho@ufu.br		

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e meta dados ficarão sempre disponibilizados.