

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Alisson Luiz Diniz Silva

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL EM RAÇÃO, SAIS
MINERAIS E SUPLEMENTOS DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM GERAÇÃO DE
HIDRETOS

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEx/DQ. 1380

D. 748

Alisson Luiz Diniz Silva

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO
DE ARSÊNIO TOTAL EM RAÇÃO, SAIS MINERAIS E SUPLEMENTOS DE
ALIMENTAÇÃO ANIMAL POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATOMICA
COM GERAÇÃO DE HIDRETOS

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química - Analítica

Orientador: Prof^o Dr. Guilherme Dias
Rodrigues

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

S586d Silva, Alisson Luiz Diniz
2020 Desenvolvimento e validação de método para
D determinação de arsênio total em ração, sais minerais
e suplementos de alimentação animal por espectrometria
de absorção atômica com geração de hidretos
[manuscrito] / Alisson Luiz Diniz Silva. 2020.
[x], 55 f. : il.

Orientador: Guilherme Dias Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Nutrição animal -
Contaminação - Teses. 3. Resíduos de arsênio - Teses.
4. Alimentos - Contaminação - Teses. 5. Segurança
alimentar - Teses. 6. Preparação de amostra (Química)
- Teses. 7. Espectroscopia de absorção atômica -
Teses. 8. Hidretos - Teses. I. Rodrigues, Guilherme
Dias, Orientador. II. Título.

CDU 043

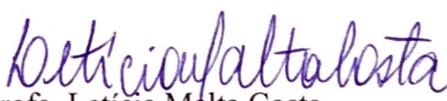
"Desenvolvimento e Validação de Método para a Determinação de Arsênio Total em Ração, Sais Minerais e Suplementos de Alimentação Animal por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos"

Alisson Luiz Diniz Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Guilherme Dias Rodrigues - Orientador
UFMG


Dr. Thiago Freitas Borgati
LFDA - MG


Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Quando se nasce pobre não se tem muitas opções. Alguns se revoltam e outros, como eu, tem o privilégio de tentar transformar a sua realidade e a sua vida. Logo de início percebemos que a tarefa não é fácil, que as chances são únicas e que você tem que ser forte, sempre forte, e viver numa luta inconstante para ser bom e aí respeitado. E o melhor de tudo é que ninguém te conta como fazer, mas todos te cobram os resultados. A caminhada é longa, mas não caminhamos sozinhos. Existem pessoas boas e ruins que vão junto, e aos poucos vamos nos transformando e entendendo mais sobre a vida. Meus agradecimentos são a essas pessoas que fizeram um garoto pobre, homossexual e um pouco bobão acreditar que poderia chegar até aqui. Agradeço primeiramente aos meus pais, Antônio e Maria, que desde o início me ensinaram a importância de se estudar. Para eles que não tiveram tal oportunidade, mas que se sacrificaram ao máximo para que meus irmãos e eu tivéssemos acesso à educação, deixo o meu muitíssimo obrigado. Aos meus irmãos, Nayara e André, à minha cunhada Milene e à minha afilhada Alice, meus agradecimentos pelo apoio, convívio e momentos. Aos amigos do meu coração que fazem parte da minha vida desde o ensino médio, Anna e Bruno, minha imensa gratidão por cada minuto de aprendizado, conselhos e verdades singulares ditas na cara. Às amigas especiais que o CEFET me deu, Dani e Carla, a química não teria o mesmo sentido sem vocês, nossa amizade cresceu de uma forma tão gostosa e tudo começou fazendo o cartão C&A. Ao Marlon, pela companhia ao longo dessa dissertação. Ao Meu orientador pela calma e orientação, pela paciência principalmente na reta final desse trabalho. Aos queridos do LAB 214 em especial, Roberta, Juniele e Pablito, que me acolheram tão bem quando tão pouco eu estive presente. Aos amigos do LEI, Gabriel e Christiane, que há cinco anos convivem com meu bom humor matinal nas segundas. Ao bonde do Lanagro, amigos incríveis que a vida me deu. Ao pessoal do LFDA-MG pelo convívio diário e nem

sempre só de flores, principalmente ao amigo da vida e afilhado Felipe, que divide as dificuldades diárias desde 2010. E por fim, a todos que de alguma forma estão presentes nessa caminhada louca chamada vida.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a otimização e validação de um método para a determinação de arsênio total com abertura por digestão ácida em vaso aberto. A quantificação foi realizada por geração de hidreto acoplado a espectrometria de absorção atômica – HG-ASS. A técnica apresentou bons resultados para a investigação de arsênio nas sete matrizes de trabalho: fosfatadas e algas marinhas calcárias; carbonatadas e conchas marinhas calcárias; óxidos de magnésio e carbonado de magnésio; sais de cobre e carbonato ferroso; óxidos de zinco, manganoso e cúprico; premix e ração animal. A otimização do preparo de amostra e instrumental foi realizada por meio de planejamento fatorial, 2^3 e 2^2 completo, respectivamente. Não foi evidenciado efeito de matriz para o método proposto, o que permitiu a quantificação do analito em matrizes diferentes utilizando a mesma curva analítica. Os limites de quantificação encontrados foram de 2,0; 3,0; 6,0; 10; 20; 2,0 e 0,4 mg kg⁻¹ nas matrizes fosfatadas, carbonatadas, óxidos de magnésio, matrizes sulfatadas, óxidos de zinco, mistura mineral e rações, respectivamente. Todos os limites correspondem a um quinto do limite permitido na legislação Brasileira, e no acordo internacional firmado com a União Europeia, com exceção da matriz de óxido de magnésio. A recuperação do método variou de 88-98%, nos níveis de concentração correspondentes ao limite máximo de resíduo. Todos os valores de incerteza apresentam conformidade com a legislação, pois mantiveram uma concordância com o limite máximo de incerteza recomendado.

Palavras-chave: Alimentação animal; Contaminação inorgânica; Arsênio; Absorção atômica com geração de hidreto (HG-AAS); Segurança alimentar

ABSTRACT

This study was carried out the optimization and validation of a method for the determination of total arsenic using acid digestion in an open flask. Quantification was performed by hydride generation coupled to atomic absorption spectrometry – HG-AAS. The technique proved to be promising for the investigation of arsenic in the seven matrices: phosphate and calcareous seaweed; carbonates and limestone marine shells; magnesium oxides and magnesium carbonate; copper and ferrous carbonate salts; zinc, manganous and cupric oxides; premix and animal feed. The optimization of the sample preparation and instrumental was performed through multivariate analysis. There was no matrix effect for the proposed method, which allowed the analyte to be quantified in different matrices using the same analytical curve. The LOQ were 2.0; 3.0; 6.0; 10; 20; 2.0 e 0.4 mg kg⁻¹ for phosphate and carbonated matrices, magnesium oxides, sulfated matrices, zinc oxides, mineral mixture and feed, respectively. All limits correspond to one fifth of the allowed limit under Brazilian law, and in the international agreement signed with the European Union, except for magnesium oxide matrix. The recovery of the method varied from 88-98%, at the concentration levels corresponding to the maximum residue limit. All uncertainty values are following the legislation, as they maintained an agreement with the recommended allowed uncertainty limit.

Keywords: Animal feed; Inorganic contamination; Arsenic; hydride generation coupled to atomic absorption spectrometry (HG-AAS); food control

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Fluxograma resumo do procedimento analítico	26
Figura 2: Gráfico dos efeitos para o equipamento. A) Fluxo de gás, B) Concentração da solução de borohidreto de sódio e AB) interação entre os fatores A e B	27
Figura 3: Absorbância x tempo de reação (s) onde na rotina há apenas a alíquota do padrão e cobre os dados da absorbância na presença de matriz de sulfato de cobre Absorbância x tempo de reação (s).....	30
Figura 4: Gráficos de efeito para a otimização do preparo das amostras – A) volume de HCl; B) Pré-calcinação, C) Volume de nitrato de magnésio, AB) interação entre os fatores A e B, AC) interação entre os fatores A e C, BC) interação entre os fatores B e C, ABC) interação entre os fatores A, B e C	33
Figura 5: Gráfico de resíduos em função da concentração	36
Figura 6: Curva analítica para avaliação da Linearidade	36
Figura 7: Curva analítica para as matrizes em estudo	37
Figura 8: Gráficos de efeito para a robustez – A) Tempo de digestão ; B) tempo de reação e AB) interação entre os fatores A e B.....	46
Figura 9: Gráficos de efeito para robustez da razão – A) Tempo de digestão; B) Tempo de reação; C) Tempo de mufla; AB) interação entre os fatores A e B, AC) interação entre os fatores A e C, BC) interação entre os fatores B e C, ABC) interação entre os fatores A, B e C	47

LISTA DE TABELAS

	Pg.
Tabela 1: Limites de As em alimentos segundo o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC - MAPA - 2019	2
Tabela 2: Limites máximos de As segundo a RDC 42 de 2013 da ANVISA.....	9
Tabela 3: Limites máximos permitidos de As em produtos destinados a Alimentação animal.....	12
Tabela 4: Alíquota de matriz adicionada na reação.....	21
Tabela 5: Alíquotas utilizadas na verificação do LQ do método	23
Tabela 6: Planejamento 2 ² para otimização das condições do equipamento.....	27
Tabela 7: Dados experimentais das absorvâncias de As na ausência e presença de cobre em diferentes tempos de reação	29
Tabela 8: Planejamento de Experimento 2 ³ para preparo de amostra em diferentes matrizes de alimentação animal.....	31
Tabela 9: Valores dos efeitos observados para os parâmetros em estudo em função de matriz avaliada.....	32
Tabela 10: Dados para a avaliação da existência de efeito de matriz significativo para as matrizes em estudo	39
Tabela 11: Valores de LD e LQ para As nas diferentes matrizes experimentais	40
Tabela 12: Valores de repetitividade por matriz para os valores de LQ e LMR.....	41
Tabela 13: Valores para avaliação da precisão intermediária por matriz para os valores de LQ e LMR	42
Tabela 14: Resultados das análises de recuperação por matriz.....	43
Tabela 15: Resultados das participações em Ensaio de Proficiência para As	44
Tabela 16: Planejamento Experimental 2 ² completo para Robustez em diferentes matrizes de alimentação animal.....	45

Tabela 17: Planejamento Experimental 2^3 completo para Robustez na matriz de ração animal	45
Tabela 18: Incerteza padrão combinada e incerteza máxima para o LMR	48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR - Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças

DMA – Ácido dimetil arsênio

EP – Ensaio de Proficiência

HG-AAS - Geração de hidretos acoplada a espectrometria de absorção atômica

HG-AFS - Geração de hidreto acoplada a espectrometria de fluorescência atômica

HG-ICPOES - Geração de hidreto acoplada a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

LD - Limite de detecção

LFDA-MG - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais

LMR - Limite máximo de resíduo

LQ - Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MMA - Ácido monometil arsênio

PNCRC - Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2 - Revisão bibliográfica.....	5
2.1 Arsênio: histórico e propriedades	5
2.2 Arsênio em alimentos de consumo humano	7
2.2.1 A suplementação animal na produção de carne	10
2.2.1.1 - A importância econômica dos alimentos para animais.....	10
2.3 Quantificação de arsênio em alimentos	12
2.3.1 Preparo de amostra	12
2.3.2 Técnicas para a quantificação do arsênio	13
3 Objetivos.....	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4 Metodologia.....	18
4.1 Padrões e Reagentes	18
4.2 Delineamento experimental	18
4.2.1 Condições instrumentais	18
4.2.2 Etapa da redução das espécies de arsênio	19
4.2.3 Avaliação da etapa de digestão das amostras	20
4.2.3.1 Condições gerais	20
4.2.3.2 Delineamento experimental da digestão.....	20
4.3 Validação do método	21
4.3.1 Linearidade e faixa de trabalho	21
4.3.2 Efeito de matriz e seletividade.....	22
4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	22

4.3.4 Precisão.....	23
4.4 Veracidade/Recuperação	24
4.5 Robustez	24
4.6 Incerteza	25
5 Resultados e Discussão	26
5.1 Condições do Espectrômetro de Absorção Atômica por Geração de Hidretos acoplado ao sistema de injeção em fluxo.....	27
5.2 Tempo de reação para a redução das espécies em As (III).....	28
5.3 Delineamento da etapa de digestão	30
5.4 Parâmetros da validação.....	35
5.4.1 Linearidade	35
5.5 Avaliação do Efeito matriz.....	36
5.6 Limite de Detecção e limite de Quantificação	40
5.7 Precisão.....	40
5.8 Veracidade/Recuperação	43
5.9 Robustez	44
5.10 Incerteza de medição no LMR	48
6 Conclusões	49
7 Referências bibliográficas.....	51
8 Apêndice 1 – Método de análise	56

1 - Introdução

A ubiquidade dos metais na natureza é um fator relevante para o desenvolvimento das mais diversas espécies animais e vegetais, incluindo a espécie humana [1]. Alguns metais são considerados essenciais para a sobrevivência de espécies, enquanto outros, em doses pequenas, apresentam elevada toxicidade. Dentre os metais desse segundo grupo, o arsênio ocupa o primeiro lugar na lista de prioridade da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR). Nessa lista os elementos estão organizados em função da sua ocorrência, toxicidade e potencial exposição humana [2].

Ao longo da história são inúmeros os casos relatados de envenenamento por arsênio, dada à facilidade de se misturar seus sais em alimentos [3]. No ambiente, o arsênio está presente em diversas formas de ocorrência natural, sendo que as formas inorgânicas, arsenito (AsO_2^-), arsina (AsH_3) e arsenato (AsO_4^{3-}), são consideradas mais nocivas à saúde humana em comparação com as estruturas metiladas, metil e dimetil arsênio, e com as demais estruturas orgânicas, arsenobetaina e arsenocolina. Com essa dispersão natural, compostos de arsênio podem contaminar água, alimentos ou suplementos alimentares destinados à alimentação humana e animal [1,4].

No Brasil, no que tange a alimentação animal, a suplementação mineral e a ração são muito utilizadas nas culturas de bovinos, suínos e aves. Na ração, a contaminação pelo arsênio pode ocorrer devido ao uso de resto de cultivares, como o arroz. A suplementação mineral é realizada através da adição de sal mineral, mistura de rochas calcáreas e fosfatadas com outros minerais nutrientes como cobre, selênio, zinco, ferro e cobalto. O arsênio pode estar presente como contaminante natural nessas rochas [5]. *Molognoni e colaboradores*, em 2016, relataram a contaminação de ração com metais tóxicos [6]. Estudo realizado entre 2012 e 2017 na Irlanda, evidenciou a contaminação por arsênio

em algas utilizadas na composição da ração animal [7]. Uma vez que o alimento se contamina, o animal pode se contaminar em seguida.

A ingestão de arsênio pelo animal pode causar diversas patologias em seu organismo, tais como aumento da permeabilidade capilar, fragmentação da bainha mielínica, infiltração gordurosa do fígado e, em casos mais agudos, causar problemas circulatórios e nos rins. A contaminação do animal pode ser transmitida para os humanos através do consumo de alimentos de origem animal. No estudo realizado por *Castro-González e colaboradores* [8] foi identificada a contaminação por arsênio do leite de vaca e de derivados do leite, como o queijo, oriundos de uma região de animais contaminados com o elemento.

Baseado na potencialidade de contaminação humana, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil, e órgão similares em outros países, editam normas de controle de produção de alimentos com valores limites para a ocorrência de arsênio em carnes, peixes, leites e derivados e vegetais, alguns desses valores estão apresentados na Tabela 1 [9].

Tabela 1: Limites de As em alimentos segundo o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC - MAPA - 2019

Matriz alimentar	Limite ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Rim Bovino	1000
Rim Suíno	1000
Fígado de Aves	1000
Leite	50 ¹
Mel	300 ¹

¹ Para o Leite e mel o limite é expresso em $\mu\text{g L}^{-1}$

No Brasil, além do controle do alimento humano, o MAPA preconiza também o controle de arsênio na alimentação do animal destinado para a alimentação humana. E a fiscalização é realizada por meio de análises de quantificação de As pelos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA).

Dentre as técnicas instrumentais mais aplicadas para a quantificação de arsênio estão a espectrometria atômica e a espectrometria de massas [10]. Vários trabalhos aplicaram as técnicas espectrométricas por conseguirem alcançar limites significativamente baixos, na ordem de centenas de microgramas por quilo, quanto acoplada à técnica de geração de hidretos [11-14]. Quando existe a necessidade de quantificações em limites mais baixos e especiação de diversas espécies de As, destaca-se o uso da espectrometria de massas e suas hifenações com a cromatografia [10,15-17].

As técnicas de massas ganharam espaço no final dos anos de 1980, devido a sua alta seletividade, e por permitir quantificações muito baixas ($< \mu\text{g L}^{-1}$). Contudo, o alto custo ainda é um limitante para o uso da técnica, abrindo espaço para outras menos dispendiosas, com destaque para a geração de hidreto acoplada a espectrometria atômica (HG-AAS) [18].

A HG-AAS é uma das principais técnicas espectrométricas utilizadas na determinação de arsênio inorgânico em alimentos [10]. Para o bom funcionamento da técnica, procedimentos eficientes de abertura de amostra, que levem a destruição do conteúdo orgânico, são essenciais. Contudo, os resíduos de ácido de outros oxidantes utilizados na digestão das amostras, como o peróxido de hidrogênio, devem ser minimizados. Estes oxidantes podem interferir na redução das espécies de arsênio da amostra em As (III). Essa etapa de redução é essencial na determinação por HG AAS [19].

Como vantagem da utilização de HG AAS, destacam-se: a separação do analito da matriz, a maior eficiência do sistema de introdução de amostras e o aumento da sensibilidade analítica. Como limitações da técnica podem ser citadas a susceptibilidade a interferentes [20,21].

Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e a validação de um método para a determinação de arsênio total em sete matrizes de alimentos para animais, sendo elas: matrizes fosfatadas e algas marinhas calcárias; matrizes carbonatadas e conchas marinhas calcárias; óxidos de magnésio e carbonado de magnésio; sais de cobre e carbonato ferroso; óxidos de zinco, manganoso e cúprico; premix e ração animal.

2 - Revisão bibliográfica

A toxicidade é uma questão de dose ou tempo de exposição, da forma física e química do elemento e da via de administração/adsorção. Os elementos podem ser divididos em dois grandes grupos, elementos essenciais e elementos não essenciais. Os elementos essenciais são aqueles que participam dos processos metabólicos de algum organismo vivo e quando ausentes provocam deficiências funcionais; e os não essenciais são aqueles que não apresentam importância metabólica, sendo em geral tóxico para os organismos, mesmo em pequenas quantidades [22,23].

Cerca de 20 elementos são considerados tóxicos para o homem, destes, 10 são largamente utilizados em nossas atividades industriais, o que justifica o maior número de estudos a eles relacionados. Esses dez elementos são o Hg, Cd, Pb, As, Mn, Tl, Cr, Ni, Se e Te que apresentam alta capacidade de acumulação e seus efeitos persistem, mesmo após o fim da fonte de poluição [23].

2.1 – Arsênio: histórico e propriedades

Descoberto em 1250 por Alberto Magno, o elemento químico de número atômico 33 com densidade de $5,7 \text{ g cm}^{-3}$ a 14°C foi denominado Arsênio. Sua aparência física varia de acordo com o estado alotrópico, sendo o cinza metálico a sua forma mais estável [24].

Devido às suas características físico-químicas, há aplicação desde a siderurgia à indústria farmacêutica, com destaque para a sua ação conservante em couro e madeira. Seu uso mais antigo data de 400 anos a.C como fármaco utilizado por Hipócrates [3]. Dentre as aplicações mais nobres estão o uso do trióxido de arsênio no tratamento de câncer de sangue e o uso do arsenato de gálio como semicondutor. Devido a sua atividade biológica,

possui aplicação ainda como herbicida (arsenito de sódio), inseticida (arsenato de chumbo) e desfolhantes [25,26].

Na natureza, o arsênio ocorre em espécies químicas orgânicas e inorgânicas, formas solúveis e pouco solúveis, estando presente em várias formas minerais, sendo a pirita a mais comum. Quanto ao estado de oxidação, está presente em quatro formas arsenato (+5) arsenito (+3), arsino (-3) e o metal (0). As espécies solúveis geralmente ocorrem no estado de oxidação +3 e +5 [24].

Devido a sua origem natural e às aplicações desse elemento em atividades agrícolas e industriais, estima-se que um adulto consuma, em média, entre 0,025 e 0,033 micrograma de As por quilo por dia. De forma eventual, a ingestão de água e alimentos contaminados pode aumentar significativamente essa quantidade e trazer danos ao organismo sendo essa a principal forma de intoxicação humana [25].

No organismo, a toxicidade do arsênio está relacionada com a sua alta capacidade de ser absorvido seja por inalação ou ingestão. A exposição crônica pode levar a uma série de doenças, como conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças vasculares e no sistema nervoso central, erupções cutâneas e ao desenvolvimento de câncer [26]. É importante destacar que o Arsênio ocupa o primeiro lugar no ranking de toxicidade da Agência de Registro de Substância Tóxicas [2]. Sua periculosidade ao organismo humano está relacionada diretamente a forma de apresentação dos compostos. As formas inorgânicas são 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas e dentre as formas inorgânicas o arsênio trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico que o pentavalente (arsenato) [25-27]. *Burguera e colaboradores* em 1991 [28], propuseram a seguinte ordem de toxicidade para os compostos mais comuns: arsina > arsenito > arseniato > ácidos alquil-arsênicos (MMA e DMA) > compostos de arsênio > arsênio elementar.

Existindo, ainda, no ambiente, espécies de arsênio consideradas não tóxicas para o organismo como arsenobetaína e arsenocolina presentes principalmente em algas e animais marinhos [29].

O organismo tenta se desintoxicar do arsênio convertendo espécies mais tóxicas em menos tóxicas, principalmente, transformando as espécies mais tóxicas em MMA ou DMA, que são facilmente excretados pela urina. As espécies que entram no trato digestivo ou respiratório na sua forma menos tóxica ou não tóxica (DMA, MMA, arsenobetaína e arsenocolina), geralmente são excretadas pela urina sem modificação [26].

2.2 - Arsênio em alimentos de consumo humano

Inúmeros são os alimentos consumido pelo homem diariamente, sendo a maioria processado e industrializado. A contaminação do alimento com arsênio pode se dar de forma natural ou por contribuição humana. Frutos do mar e algas são exemplos de alimentos naturalmente contaminados uma vez que esses organismos removem as impurezas da água do mar e as aprisionam em sua estrutura. Porém, nesses alimentos, a forma predominante é a arsenobetaína, não tóxica, sendo facilmente excretada pela urina. Em contra partida, em alimentos como carne e cereais, ingeridos diariamente pela população, o percentual de arsênio inorgânico é superior ao 1% encontrado nos alimentos de origem marinha [30]. Em relação a carne e seus derivados, estima-se que o consumo deve crescer cerca de 1,9% ao ano, entre 2014 e 2023, o que se traduz num incremento de 22% no período e juntamente com esse aumento ocorre o aumento do consumo de As se o alimento apresentar contaminação [31].

Dessa forma, existe um grande volume de trabalhos que buscam identificar e quantificar contaminações por As em vários tipos de alimentos ressaltando peixes [31], vegetais e grãos com destaque para o arroz [25, 32, 33], carnes e produtos de origem animal [34,35].

Fateme e colaboradores em 2019 [36], mostraram que até mesmo o leite materno pode ser fonte de contaminação de arsênio.

Dessa forma, o estabelecimento de níveis de segurança de As em alimentos é realizado conforme legislação de cada país. No Brasil, os órgãos responsáveis são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA.

O MAPA fiscaliza e gerencia toda a cadeia produtiva dos alimentos sob a sua jurisdição uma vez que a contaminação pode ocorrer por diferentes mecanismos como o uso de água contaminada na irrigação, plantio em solo contaminado e uso de agroquímicos (termo brasileiro para denominar pesticidas e outros produtos químicos aplicados na plantação), no que tange à produção vegetal. A Tabela 2 apresenta os limites permitidos de As em alimentos segundo a RDC, número 42 de 2013 da ANVISA [37] que servem como base da fiscalização.

Na produção de carnes e derivados, as principais fonte de contaminação são a ingestão de água contaminada e as fontes de suplementação animal minerais e orgânicas [34]. É importante ressaltar que o arsênio foi utilizado como promotor de crescimento em aves durante muitos anos [38], sendo essa prática proibida na União Europeia em 1999, o que foi seguido mais tarde pelos Estados Unidos e pelo Brasil. Contudo, ainda hoje, existem países em que o uso de As para este fim é permitido.

Tabela 2: Limites máximos de As segundo a RDC 42 de 2013 da ANVISA

Categorias	Limite máximo (mg/kg)
Óleos e Gorduras comestíveis de origem vegetal e ou animal (incluindo margarina)	0,10
Açúcares	0,10
Mel	0,30
Balas, Caramelos e similares incluindo Goma de Mascar	0,10
Pasta de cacau	0,50
Chocolates e produtos de cacau com menos de 40 % de cacau	0,20
Chocolates e produtos a base de cacau com mais de 40 % de cacau	0,40
Bebidas analcoólicas (excluídos os sucos)	0,05
Sucos e néctares de frutas	0,10
Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho	0,10
Vinho	0,20 mg/L
Cereais e produtos de e a base de cereais, excluídos trigo, arroz e seus produtos derivados e óleos	0,30
Trigo e seus derivados exceto óleo	0,20
Arroz e seus derivados exceto óleo	0,30
Hortaliças do gênero Brassica excluídas as de folhas soltas	0,30
Hortaliças de folha (incluídas as Brassicas de folhas soltas) e ervas aromáticas frescas	0,30
Hortaliças Frutos com folhas em bainha	0,10
Hortaliças Frutos da família Cucurbitaceae	0,10
Hortaliças frutos distintas da família Cucurbitaceae	0,10
Cogumelos (exceto os do gênero Agaricus, Pleurotus e Lentinula ou Lentinus)	0,10
Hortaliças leguminosas	0,10
Legumes (sementes secas das leguminosas) exceto soja	0,10
Cogumelos do gênero <i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinula</i>	0,30

2.2.1 - A suplementação animal na produção de carne

O consumo de carne cresce de forma significativa no Brasil e no mundo [31] e, em países mais pobres ou em desenvolvimento, consumir carne está atrelado também a status social. Por esse motivo, a produção de gado deve aumentar entre 60 e 70% a nível mundial até o ano de 2050 [27].

A carne bovina e de aves são as mais consumidas pela população brasileira [39]. Na região sudeste, a ingestão média de carne bovina e de aves é de 67 e 33 g/pessoa/dia, respectivamente [40]. Para atender esse crescente mercado a produção de carne também precisa aumentar e, posteriormente, se manter constante.

Entretanto, devido aos períodos de estiagem onde falta pastagens, ao grande número de animais que precisam ser alimentados e à pobreza mineral do solo de algumas regiões, o produtor necessita suplementar a alimentação da sua produção [38]. Dentre os suplementos, temos as rações, sais minerais, premix, misturas minerais e outros. Os premix são misturas homogêneas de micronutrientes que são adicionados nas formulações de rações. Podem ser de base orgânica ou mineral e os principais micronutrientes em sua composição são as vitaminas, aminoácidos e sais minerais.

2.2.1.1 - A importância econômica dos alimentos para animais

O mercado de alimentos para animais movimenta mais de 450 bilhões de dólares ao ano, com uma produção estimada em 980 toneladas [41]. A base da produção é bem diversificada contando com algas marinhas, milho, soja, pena de frango, rochas e outras matrizes minerais.

Na busca por custos menores de produção para aumentar a participação no mercado, algumas indústrias produtoras de alimentos para animais fazem usos de fontes de matéria-

prima de baixa qualidade como rochas de regiões ricas em As, que podem ser fontes de contaminação [38]. Muitos trabalhos mostram histórico de alimentos para animais contaminados com elementos tóxicos. *Gonçalves e colaboradores* [38] estudaram a contaminação de Cd e Pb em suplementação de fosforo no estado de Goiás, onde encontraram concentrações acima dos limites permitidos na legislação brasileira. *Monagail e colaboradores* [27] estudaram em 2014 a contaminação por As em algas base para a produção de suplemento para gado, no trabalho foi verificado que a concentração de As no alimento tem relação com a granulometria do material. Nesse trabalho a absorção de As do alimento pelo organismo animal foi pouco significativa, provavelmente por se tratar de contaminação de As na forma de arsenobetaína que não apresenta toxicidade ao organismo. Em 2016, *Adamse e colaboradores* [42] estudaram a contaminação por chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio em diversas matrizes minerais e em ração. O estudo evidenciou que alimentos produzidos com algas marinhas tendem a ter altas concentrações de As. Os autores chamam atenção ao monitoramento de ração mineral de origem animal, matéria-prima de origem marinha, especialmente farinha de peixe, algas, bem como aditivos de oligoelementos (sulfato cúprico, óxido de zinco e óxido de manganês para arsênio).

O alimento do animal contaminado pode atuar como uma fonte de contaminação para o próprio animal, bem como os produtos dele derivados, como por exemplo, carne, leite, ovos e outros [42]. Nos animais, a concentração de elementos tóxicos tende a ser maior nos rins, fígado e músculos.

Dessa forma, a regulamentação e fiscalização da produção de alimento para animais surge como uma forma de assegurar a qualidade também da produção de carnes e derivados. Em 2004, a União Europeia editou o regulamento 882 que estabelece as regras para controle oficial da produção de alimentos para animais. Mais recentemente, em 2013 o

Brasil adotou os mesmos níveis de controle de elementos tóxicos aplicados na UE (Tabela 3) [43]. Assim, metodologias analíticas que permitam a quantificação de contaminantes nessas matrizes se fazem necessárias.

Tabela 3: Limites máximos permitidos de As em produtos destinados à Alimentação animal

Produto	Limite máximo permitido (mg/kg)
Fosfatos e algas marinhas calcárias	10
Carbonato de cálcio, carbonato de cálcio e magnésio, conchas marinhas calcárias	15
Óxido de magnésio, carbonato de magnésio	20
Aditivos para alimentação animal pertencentes ao grupo funcional dos compostos de oligoelementos com exceção de:	30
Sulfato cúprico penta-hidratado, carbonato cúprico, cloreto e tri-hidróxido de dicobre, carbonato ferroso	50
Óxido de zinco, óxido manganoso e óxido cúprico	100
Ração	2
Alimentos para peixes e alimentos para animais de companhia	10

2.3 - Quantificação de arsênio em alimentos

2.3.1 - Preparo de amostra

As formas de se preparar as amostras para a quantificação de arsênio são as mais variadas possíveis, indo desde procedimentos simples de destilação a procedimentos mais sofisticados em fornos que empregam a radiação de micro-ondas. A escolha do preparo vai depender do que se deseja determinar (arsênio total ou especiação), e é crucial para o sucesso do procedimento analítico. [10,25,26,44]

Nos procedimentos voltados à especiação do arsênio é mais comum o emprego de sucessivas lixiviações e/ou extrações, buscando a remoção das espécies de arsênio da matriz sem a degradação das mesmas ou a interconversão em outras espécies. Quando o que se busca é a determinação de arsênio total os procedimentos de digestão ácida em vaso aberto ou fechado, ou ainda a digestão aplicando-se micro-ondas, são mais aplicados. [10,26]

Nas digestões ácidas em vaso aberto, principalmente nas que se empregam ácido clorídrico, deve-se ter o cuidado especial para evitar a perda de arsênio por volatilização, uma vez que o cloreto de arsênio três é volátil. Nesse caso o uso de óxido e/ou nitrato de magnésio são empregados para evitar a volatilização do arsênio provocando a mineralização do mesmo, que se mantém na forma de óxido. Se a determinação do arsênio for realizada por uma técnica que exija a redução das espécies antes da quantificação, outro cuidado a se tomar quanto ao uso de ácido oxidantes e outros oxidantes é a acidez residual ao final do processo de digestão. O excesso de oxidantes pode interferir nas etapas de redução do arsênio subestimando o valor quantificado. [18-21,26]

2.3.2 - Técnicas para a quantificação do arsênio

Nos últimos anos muitas técnicas analíticas para a determinação de concentrações até menores que ppb foram desenvolvidas e, apesar dos benefícios apresentados, nenhuma por si só resolve todos os problemas devido a grande diversidade de matrizes encontradas. As técnicas instrumentais para a quantificação podem ser divididas em dois grandes grupos: espectrometria atômica e espectrometria de massas [10].

No que se refere a espectrometria atômica, destaca-se a geração de hidretos acoplada a espectrometria de absorção atômica (HG-AAS) [12, 13], a geração de hidreto acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (HG-AFS) [14] e a geração de hidreto acoplada

à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (HG-ICPOES) [15]. No que corresponde a espectrometria de massas, destaca-se a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e suas hifenções com a cromatografia líquida para os ensaios de especificação [11,16,17].

As quantificações envolvendo ICPOES e ICP-MS ganharam espaço ao final da década de 1980, com maior destaque para a técnica de massas devido à sua alta seletividade, e por fornecer limites de detecção e quantificação muito baixos (inferiores a $\mu\text{g L}^{-1}$), mesmo quando acoplado a sistemas de cromatografia. Entretanto, o alto custo de aquisição, manutenção e de operação desse sistema faz com que sua aplicação em rotina analítica se torne onerosa, abrindo espaço para técnicas menos dispendiosas. Além disso, esses equipamentos não são indicados para amostras que apresentam um teor de sólidos dissolvidos muito alto, que levam à alteração da eficiência de nebulização, maior corrosão da tocha, aumento de interferência (formação de compostos poliatômicos) e menor eficiência de ionização [10,19,26].

A HG-AAS é uma das principais técnicas espectrométricas utilizadas na determinação de arsênio inorgânico em alimentos. A técnica apresenta valores de quantificação na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, podendo chegar a centenas de ng L^{-1} . Permite ainda a especificação das espécies de arsênio III e V [10,26], e de forma mais trabalhosa a especificação de algumas espécies orgânicas. Nessa técnica, o hidreto é formado após de reação de decomposição do borohidreto de sódio, ou outro agente redutor, em meio ácido (Eq. 1), com posterior reação do hidrogênio liberado com o analito para a formação do hidreto do metal (Eq. 2), onde m pode ser ou não igual a n e X é o analito de interesse [18,19].



Sabe-se contudo, que a cinética da reação de formação do hidreto depende do pH do meio e da espécie de arsênio envolvida. O As (III) reage cerca de dez vezes mais rápido de o As(V) na formação do hidreto, sendo esse um mecanismo aplicado na especiação dessas espécies. Algumas espécies orgânicas não reagem com o borohidreto precisando serem convertidas a formas reativas [18,19].

Na quantificação de arsênio total comumente um redutor é aplicado na amostra, ou em uma alíquota da mesma, após a digestão, com o objetivo de reduzir as espécies presentes à As(III). Dentre os redutores mais aplicados estão o iodeto de potássio em meio fortemente ácido e a L-cisteína. Quando utilizado o KI, o iodo formado precisa ser removido do meio antes da reação com o borohidreto para evitar a competição das espécies em reação. Uma das formas de tornar o iodo formado indisponível para competir com o As é complexá-lo. Para isso, emprega-se ácido ascórbico juntamente com a solução de iodeto de potássio.[17]

Dentre as vantagens da utilização de HG-AAS, destacam-se: a separação do analito da matriz, a maior eficiência do sistema de introdução de amostras comparado à nebulização pneumática convencional e o aumento da sensibilidade analítica. Como limitações da técnica podem ser citadas a susceptibilidade a interferentes [21,22].

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método para determinação de arsênio total em ração, sais minerais e suplementos da alimentação animal por HG-AAS

3.2 - Objetivos Específicos

- Otimizar as variáveis empregando ferramentas quimiométricas multivariada de planejamento de experimentos.
- Validar o método para quantificação de As nas matrizes fosfatadas e algas marinhas calcárias; matrizes carbonatadas e conchas marinhas calcárias; óxidos de magnésio e carbonado de magnésio; sais de cobre e carbonato ferroso; óxidos de zinco, manganoso e cúprico; ração animal; e, premix.
- Validar o método conforme o guia de validação do Ministério da Agricultura. Os parâmetros de mérito que serão avaliados durante a etapa de validação são aqueles preconizados no Manual da Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos [45]: linearidade, seletividade e efeito matriz, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), recuperação/veracidade, robustez e incerteza de medição.
- Elaborar o método de análise com base nos resultados de validação

- Submeter o método para acreditação junto a Coordenação de acreditação do INMETRO, em acordo com a norma ISO/IEC 17025:2017 e implementar na rotina analítica do LFDA-MG

4 - Metodologia

Todas as etapas deste trabalho foram realizadas no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais - LFDA-MG. Para os ensaios físico-químicos, todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas e imersas em ácido nítrico 5% (v/v) por pelo menos 2h. Logo após, foram enxaguadas 10 vezes com água deionizada. Foram então secas e armazenadas em local livre de contaminação até o início das análises. O tratamento de dados foi realizado com base em parâmetros estatísticos com o auxílio do software Excel® do Sistema Windows® e do MiniTab19®.

4.1 Padrões e Reagentes

O material de referência certificado de arsênio utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich com valor certificado de 1001 mg L⁻¹. O ácido clorídrico utilizado foi da marca Schalab (37% m/m). O borohidreto de sódio, com pureza de 99%, empregado nas análises foi da marca Merck. O nitrato de magnésio (98%) e o hidróxido de sódio (99%) utilizados foram da VETEC e o iodeto de potássio (99%) e o ácido ascórbico (99%) da Neon Química. O argônio 5.0 foi adquirido da empresa White Martins.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Condições instrumentais

As leituras foram realizadas no equipamento de Absorção Atômica com Geração de Hidreto (AAnalyst 400) acoplado ao sistema de injeção em fluxo (FIAS 400), ambos da empresa Perkin Elmer®. A atomização foi realizada em célula de quartzo de 10 centímetros de comprimento e 1,0 centímetro de diâmetro. A temperatura de atomização aplicada foi de 900°C, e o As foi detectado no comprimento de onda de 193,7 nm. Para o sistema de injeção em fluxo a solução carreadora foi HCl 10% (v/v), a concentração da

solução de borohidreto de sódio e o fluxo de gás (argônio) foram ajustados após planejamento 2² completo. A concentração da solução carreadora não foi objeto de estudo, uma vez que optou-se por manter a concentração igual a das amostras ao fim do procedimento de redução. Os valores testados para o fluxo de gás foram de 80 e 100 mL min⁻¹ e para a concentração de borohidreto de sódio foram de 0,1 e 0,2 % (m/v). A concentração da solução de arsênio utilizada na otimização foi equivalente ao último ponto da curva analítica 12,0 mg L⁻¹. Todos os dados foram obtidos em duplicata.

4.2.2 Etapa da redução das espécies de arsênio

Para eficiência da técnica de geração de hidreto é necessária a redução prévia das espécies de As para a sua forma trivalente. Para a etapa de redução, em um tubo de polipropileno de 15,00 mL adicionou-se, a uma alíquota do digerido ou da solução padrão, 1,5 mL da solução de redução composta por KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 5% (m/v) onde o iodeto atua como agente redutor. Para que a reação de redução 2 mL de HCl (50% v/v) também foram adicionados à solução. Antes da leitura os tubos foram avolumados para 10,00 mL.

Na avaliação do tempo de reação foi realizada uma curva de tempo de reação X absorvância do ponto médio da curva analítica. A curva foi feita na ausência de matriz (apenas a solução padrão) e na presença de 1 mL do digerido sulfato de cobre pentahidratado. O digerido de sulfato de cobre foi obtido pela digestão de 1,00 g de sulfato de cobre pentahidrato em 20 mL de HCl 50 % (v/v) em chapa na presença de 1 mL de nitrato de magnésio 50% (m/v). O digerido foi filtrado e avolumado em balão calibrado de 100,00 mL.

4.2.3 - Avaliação da etapa de digestão das amostras

4.2.3.1 - Condições gerais

Todas as amostras foram cedidas pelo Laboratório de Alimentos para Animais do LFDA-MG. As amostras foram previamente cominuídas em moinho de centrífuga e fracionadas em peneira de 0,25 mm. Por se tratar de quantificação de arsênio total, a digestão escolhida foi a ácida com o uso de HCl 50% (v/v) em vaso aberto, na presença de $Mg(NO_3)_2$ 50% (m/v). A massa de amostra utilizada foi de $1,00 \pm 0,01$ g para todas as matrizes, com exceção da matriz de ração que, devido ao limite de legislação ser baixo e a matriz apresentar menor homogeneidade, optou-se por utilizar a massa de $5,00 \pm 0,05$ g. Todos os digeridos foram filtrados e aferidos em balão volumétrico calibrado de 100,00 mL. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

4.2.3.2 Delineamento experimental da digestão

O delineamento experimental da digestão das amostras foi realizada por planejamento fatorial 2^3 completo em duplicata onde foram avaliados os fatores: volume de ácido clorídrico 50% (v/v) (15 e 20 mL); pré-calcinação por 12h das amostras a $550^\circ C$ (ausente e presente); volume da solução do estabilizante químico ($Mg(NO_3)_2$) 50% (m/v) (1 e 4 mL).

Para o procedimento, todas as matrizes foram fortificadas em seu limite máximo permitido (Tabela 3). A digestão das amostras foi realizada em um erlenmeyer aberto por 30 min ou até ebulição com adição HCl 50% (v/v). Após a digestão, as amostras foram filtradas em filtro qualitativo e avolumadas para 100,00 mL em balão volumétrico calibrado. Para cada matriz, uma alíquota do filtrado, conforme Tabela 4, foi adicionada ao tubo de 15,0 mL para a reação com 2 mL de HCl 50% (v/v) e 1,5 mL de solução composta de KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 5% (m/v). A reação foi deixada em repouso

por 30 min e então avolumada para 10,00 mL. Todo o procedimento foi realizado em duplicata real. Para avaliação do procedimento foi utilizado a absorbância de cada replicata.

Tabela 4: Alíquota de matriz adicionada na reação

Matriz	Volume da alíquota (mL)
Fosfatadas e algas marinhas calcárias	1,00
Carbonatadas e conchas marinhas calcárias;	0,667
Sulfato de cobre e ferroso	0,20
Óxido de zinco, manganoso e cúprico	0,10
Ração mineral	1,00
Premix	1,00

4.3 Validação do método

Os parâmetros de mérito que foram avaliados durante a validação são aqueles preconizados no Manual da Garantia da Qualidade Analítica de Resíduos e Contaminantes em Alimentos: linearidade, seletividade e efeito matriz, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), recuperação/veracidade, robustez e incerteza de medição.

4.3.1 Linearidade e faixa de trabalho

A faixa de trabalho testada contemplou todos os Limites máximos de resíduos (LMR) a serem verificados nas matrizes ensaiadas. As concentrações avaliadas foram de 0,0; 2,0; 4,5; 7,0; 9,5 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As III. Foram construídas seis curvas independentes com leituras em triplicata e aleatórias para cada ponto. Para a construção das curvas alíquotas de 0,00, 100, 225, 350, 475 e 600 μL de uma solução 0,5 mg L^{-1} de As foram adicionadas em balão volumétrico calibrado de 25,00 mL juntamente com os reagentes de redução,

5 mL de HCl 50 % (v/v) e 3,75 mL solução composta de KI 5% (m/v) e ácido ascórbico 5% (m/v). Após 30 min de reação os balões foram aferidos para 25,00 mL. Na avaliação dos dados a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração foi verificada através do teste de Dixon. Foi verificado o ajuste ao modelo linear sendo avaliados o coeficiente de correlação linear e os resíduos dos pontos em relação ao modelo. A homoscedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos foram avaliadas através dos testes de Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, respectivamente.

4.3.2 Efeito de matriz e seletividade

A verificação da existência de efeito matriz foi realizada pela comparação entre os valores de resposta instrumental para curvas oriundas do extrato/digerido da matriz branca fortificada e do analito em água. O extrato de matriz foi obtido pelo método delineado nos testes preliminares. Para as curvas em matriz o volume da matriz adicionada foi o mesmo apresentado na Tabela 5. Foram construídas três curvas independentes em extrato e três curvas independentes em solvente, nos seis níveis de concentração avaliados na linearidade. As leituras em triplicadas foram realizadas aleatoriamente e a avaliação do efeito de matriz foi realizada pela existência ou não de diferença estatística, em 95% de confiança, entre os valores médios da inclinação e do intercepto de ambas as curvas. Para isso foi aplicado um teste F para avaliação da variância dos dados seguido de teste t para comparação das médias.

4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Foi realizada a análise de 21 replicatas de amostras brancas para o cálculo do limite de detecção (LD) que foi estimado como sendo 3 vezes o desvio padrão da média dos ensaios com matriz branca. Para esse ensaio foram utilizadas 3 amostras brancas de cada matriz

de forma a se obter um LD para o método e não um para cada matriz. As matrizes foram digeridas conforme procedimento otimizado. O limite de quantificação (LQ) teórico foi obtido como sendo 10 vezes o desvio padrão das leituras da matriz branca. O LQ experimental foi confirmado por fortificação de sete amostras no nível de um quinto do LMR, para cada matriz, antes do procedimento de digestão. Foram aceitos como confirmatórios os resultados com recuperação entre 80-110% conforme descrito no guia de validação [45]. Para as amostras onde o LQ experimental não foi confirmado, realizou-se nova confirmação com fortificação em valor 10% maior que o esperado. Incrementos de 10% foram realizados até se confirmar experimentalmente o valor de LQ para cada uma das matrizes. As alíquotas de digerido levadas a etapa de digestão e posterior leitura estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Alíquotas utilizadas na verificação do LQ do método

Matriz	Volume da alíquota (mL)
Fosfatadas e algas marinhas calcárias	1,000
Carbonatadas e conchas marinhas calcárias;	0,667
Óxido de magnésio	0,500
Sulfato de cobre e ferroso	0,200
Óxido de zinco, manganoso e cúprico	0,200
Ração mineral	1,00
Premix	1,00

4.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária.

Para avaliar a repetibilidade foram preparados seis replicatas independentes de matrizes brancas adicionadas do analito em dois níveis de concentração (LQ e LMR), antes do procedimento de digestão das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata

em dois dias diferentes. O desvio padrão relativo da repetitividade ($RSD_r\%$) foi calculado para cada nível e dividido pelo $RSD\%$ calculado pela equação de Horwitz para se obter o valor de $HORRAT_R$. Esse valor foi avaliado em acordo com o Regulamento da comissão Europeia 333/2007 [46], que indica que o valor máximo de $HORRAT_R$ deve ser 2.

Para avaliar a precisão intermediária, ensaios, como descritos, acima foram realizados por três analistas, em dias diferentes. O desvio padrão relativo da precisão intermediária ($RSD_R\%$) foi calculado para cada nível e dividido pelo $RSD\%$ calculado pela equação de Horwitz para se obter o valor de $HORRAT_r$. Esse valor foi avaliado em acordo com o Regulamento da comissão Europeia 333/2007 [46], que indica que o valor máximo de $HORRAT_r$ deve ser 2.

4.4 Veracidade/Recuperação

Ensaios de recuperação foram realizados em sextuplicata para cada uma das matrizes no nível do LMR. Foram aceitos como válidos valores de recuperação entre 80 e 110% para cada uma das matrizes conforme preconizado pelo guia adotado. Foram realizadas participações em ensaios de proficiência que englobaram as matrizes de ração, premix de base orgânica, premix de base mineral e aditivo mineral.

4.5 Robustez

A robustez foi avaliada em condições experimentais com pequenas alterações do método proposto, segundo a abordagem de Youden. Foi elaborada uma matriz de experimentos completa 2^3 em duplicata. Os parâmetros avaliados foram: tempo de permanência na mufla, tempo de digestão em chapa, tempo na etapa de reação. Foram calculados os efeitos a partir das médias das absorbâncias. A avaliação da robustez se deu pela presença ou ausência de efeitos significativos, a 95% de confiança, para as variações nos parâmetros avaliados.

4.6 Incerteza

A incerteza da concentração analítica foi calculada pela combinação das incertezas da calibração e da reprodutibilidade intralaboratorial.

$$u_{c. \text{ anal}} = \sqrt{(c_{\text{calib}} u_{\text{calib}})^2 + u_{\text{repro}}^2}$$

onde:

c_{calib} = Coeficiente de sensibilidade obtido da equação do mensurando e como uma função da concentração do analito interpolada na curva de calibração

$$u_{\text{calib}} = \sqrt{\frac{s^2(y^*) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2 x^* cov(a, c)}{b^2}}$$

u_{repro}^2 = é a incerteza em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

x^* = valor da concentração do analito no LMR

$s^2(y^*)$ = variância da resposta instrumental estimada a partir dos parâmetros da curva

$s^2(a)$ = Variância do intercepto da curva

$s^2(b)$ = variância da inclinação da curva

$cov(a, c)$ = covariância entre o intercepto e a inclinação da curva

b = inclinação da curva

5 Resultados e Discussão

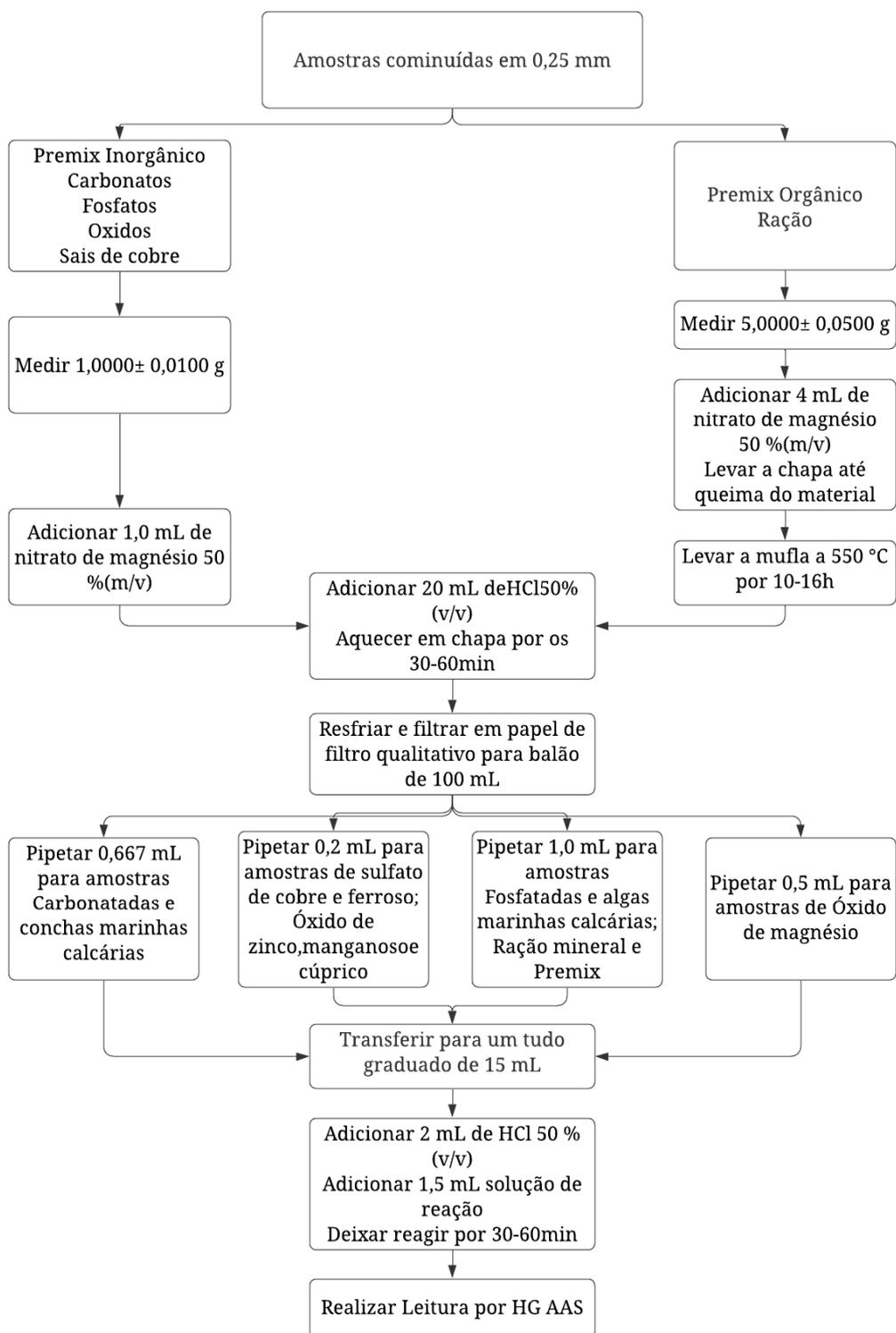


Figura 1: Fluxograma resumo do procedimento analítico

5.1 Condições do Espectrômetro de Absorção Atômica por Geração de Hidretos acoplado ao sistema de injeção em fluxo

O delineamento experimental foi realizado com um planejamento fatorial 2^2 completo, avaliando o fluxo de gás de arraste e a concentração da solução de borohidreto, conforme Tabela 6.

Tabela 6: Planejamento 2^2 para otimização das condições do equipamento

Experimento	Fluxo de gás	Concentração de borohidreto de sódio	Resposta média da triplicata de leitura
1	-1	-1	0,51785
2	1	-1	0,4194
3	-1	1	0,66205
4	1	1	0,49635

Fluxo de gás: (-1) 80 mL min^{-1} e (+1) 100 mL min^{-1} ;

Concentração de borohidreto de sódio :(-1) 0,1% (m/v) e (+1) 0,2% (m/v)

A Figura 2 apresenta os valores padronizados dos efeitos em comparação com o valor crítico de significância a 95% .

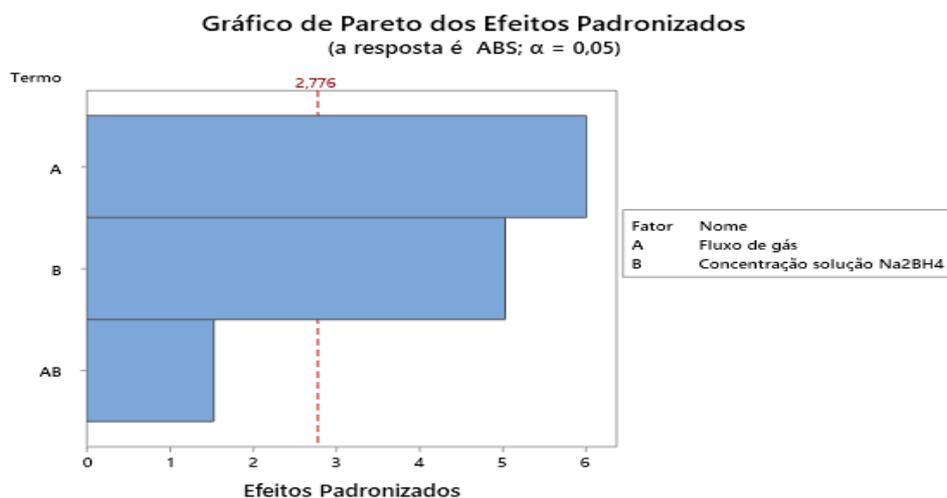


Figura 1: Gráfico dos efeitos para o equipamento. A) Fluxo de gás, B) Concentração da solução de borohidreto de sódio e AB) interação entre os fatores A e B

Ambos os fatores avaliados apresentaram efeito significativo na Figura 2. O aumento da concentração de borohidreto favorece a formação de mais radicais livres de H, provenientes da decomposição do hidrogênio nascente. Os hidretos se atomizam melhor na presença desses radicais, como descrito por Dedina [18].

Já para o fluxo de gás, pequenos incrementos podem levar a um aumento da absorvância, fato que pode ser explicado pela melhor separação do hidreto da solução. Contudo, um aumento do fluxo de gás acaba por levar a diminuição da absorvância, por diluição dos hidretos na fase gasosa. Fato similar foi observado por Ceveira *et al.* [47].

Apesar de, individualmente, os fatores analisados apresentarem influência na absorvância do analito, o fator de interação entre eles não apresentou efeito significativo sobre o resultado. Assim, a concentração da solução de borohidreto de 0,2% (m/v) e o fluxo de gás de 80 mL min⁻¹ foram selecionados como os melhores parâmetros para a quantificação e foram adotados em todas as demais quantificações desse trabalho.

5.2 Tempo de reação para a redução das espécies em As (III)

As matrizes estudadas podem apresentar alta variabilidade da composição mineral e os componentes minerais podem atuar consumindo os redutores na etapa de redução. Dessa forma, optou-se por não realizar o delineamento da quantidade de reagente desta etapa e utilizar reagentes em excesso de forma a deixar o procedimento mais robusto quanto a variabilidade amostra.

Matrizes ricas em cobre, como o sulfato de cobre, podem interferir nessa etapa do processo, isso porque o cobre (II) também é reduzido pelo iodeto a cobre (I) e ainda compete na reação, podendo se precipitar na forma de CuI. Assim, foi utilizado um excesso de 100% do volume teórico previsto para maior concentração de arsênio, na faixa de trabalho estudada: ou seja, 1,5 mL da solução composta de KI 5% (m/v) e ácido

ascórbico 5% (m/v). O volume do ácido clorídrico 50 % (v/v) adicionado foi de 2,0 mL, com o objetivo de garantir o meio fortemente ácido para facilitar a redução do As pelo iodeto e para evitar a precipitação de óxidos hidratados de metais. A redução do As acontece conforme evidenciado na equação 3.



Dessa forma, o estudo realizado envolveu o tempo de reação necessário para a conversão máximo das espécies de As (V) em As (III). Para o estudo foi realizada a reação sem a presença de matriz interferente (rotina) e na presença de matriz de sulfato de cobre, por ser a de maior interferência nessa etapa. Na reação de rotina uma alíquota do padrão foi adicionada ao meio reacional e na curva de cobre, além da alíquota do padrão, 1 mL de extrato de digerido da matriz de sulfato de cobre foi adicionado ao meio reacional. Os resultados estão expostos na Tabela 7 e organizados na Figura 3.

Tabela 7: Dados experimentais das absorvâncias de As na ausência e presença de cobre em diferentes tempos de reação

Tempo (s)	Absorvância média das triplicatas de leitura	
	Rotina (ausência de cobre)	Presença de Cobre
0	0,083	0,0872
30	0,1831	0,2355
60	0,2716	0,3143
180	0,4355	0,469
300	0,5136	0,5106
600	0,526	0,515
900	0,5265	0,5143
1200	0,533	0,5251
1800	0,5546	0,5185
2400	0,5346	0,5135
3000	0,5237	0,5216
3600	0,5284	0,5072

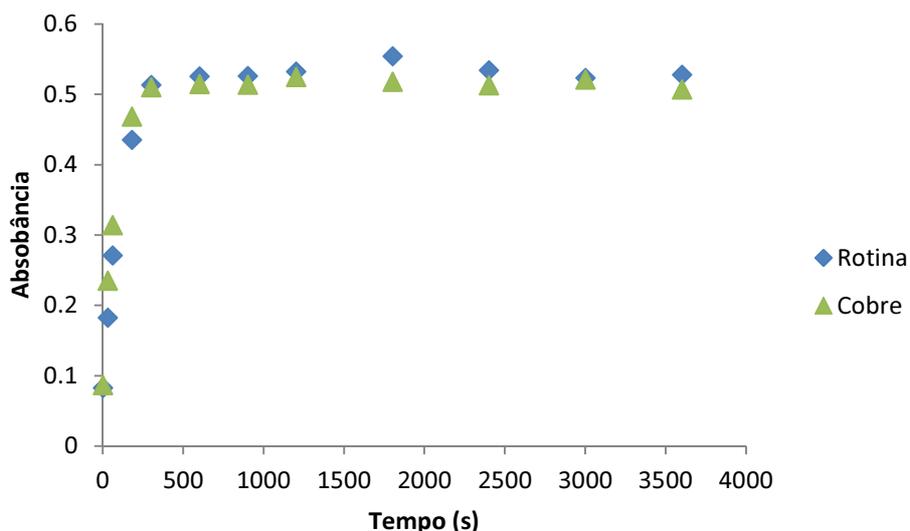


Figura 3: Absorbância x tempo de reação (s) onde na rotina há apenas a alíquota do padrão e cobre os dados da absorbência na presença de matriz de sulfato de cobre.

Os dados apresentados evidenciam que, nos primeiros minutos de reação, a absorbância de As varia bruscamente, fato correlacionado com a sua cinética da reação de redução. A absorbância atinge um valor constante em aproximadamente 600 segundos de reação. Não há diferença entre o tempo de estabilização entre a curva em rotina e a curva em matriz de sulfato de cobre, indicando que o excesso adicionado da solução redutora foi suficiente para contornar a interferência. Dentre as matrizes em estudo as ricas em cobre são as que poderiam apresentar maior efeito interferente e, por isso, foi escolhida para o estudo. Contudo, como as matrizes podem apresentar composição diversificada optou-se por ser mais conservador no tempo de reação. Dessa forma, o tempo aplicado nos experimentos desse trabalho foi de 1800 segundo, ou seja, 30 minutos para a etapa de reação.

5.3 Delineamento da etapa de digestão

O preparo de amostra foi delineado realizando-se um planejamento fatorial 2^3 completo (Tabela 8). As respostas correspondem a absorbância de arsênio adicionado nas matrizes:

1 - matrizes fosfatadas e algas marinhas calcárias; 2 - matrizes carbonatadas e conchas marinhas calcárias; 3 - sulfato de cobre e ferroso; 4 - óxidos de zinco, manganoso e cúprico; 5 – Ração animal e 6 - Premix.

Tabela 8: Planejamento de Experimento 2³ para preparo de amostra em diferentes matrizes de alimentação animal

Experimento	Volume HCl 50%	Pré-calcinação	Volume Mg(NO ₃) ₂ 50%	Absorbância média das triplicatas de leitura para As					
				1	2	3	4	5	6
1	-1	-1	-1	0,4034	0,5057	0,4319	0,4198	0,0000	0,5253
2	1	-1	-1	0,5083	0,3700	0,4543	0,4157	0,0000	0,5142
3	-1	1	-1	0,4642	0,3288	0,3701	0,4302	0,4883	0,5351
4	1	1	-1	0,5120	0,5159	0,4205	0,4000	0,2989	0,4593
5	-1	-1	1	0,3750	0,3097	0,4753	0,4343	0,0000	0,4533
6	1	-1	1	0,4657	0,4480	0,4294	0,4294	0,0000	0,4974
7	-1	1	1	0,5365	0,5356	0,4608	0,3914	0,2394	0,5221
8	1	1	1	0,5459	0,5234	0,4430	0,4238	0,4170	0,5036
9	-1	-1	-1	0,4447	0,3697	0,4854	0,4255	0,0000	0,2247
10	1	-1	-1	0,4567	0,4349	0,4306	0,3273	0,0000	0,4312
11	-1	1	-1	0,4370	0,3476	0,3851	0,4211	0,3969	0,4076
12	1	1	-1	0,4041	0,3309	0,4242	0,4308	0,3708	0,4115
13	-1	-1	1	0,4532	0,4270	0,4186	0,4473	0,0000	0,4257
14	1	-1	1	0,4504	0,4111	0,4407	0,4154	0,0000	0,4351
15	-1	1	1	0,4469	0,4319	0,4107	0,3836	0,3738	0,4110
16	1	1	1	0,4879	0,4407	0,4299	0,3914	0,3378	0,4416

Volume de ácido clorídrico 50% (v/v): (-1) 15 mL e (+1) 20 mL;

Pré-calcinação das amostras: (-1) ausente e (+1) presente;

Volume de nitrato de magnésio 50% (m/v): (-1) 1 mL e (+1) 4 mL.

Os experimentos foram realizados de forma aleatória para minimizar tendências e aumentar a robustez do modelo. Os dados da Tabela 8 foram submetidos a análise estatística para verificação dos efeitos de cada parâmetro avaliado sobre o valor final da absorbância de cada matriz em estudo. Foram analisados ainda os efeitos de interação de

segunda e terceira ordem entre os parâmetros estudados. A matriz óxido de magnésio não foi avaliada nessa etapa, porque durante o procedimento adiciona-se nitrato de magnésio em elevada concentração. Dessa forma o possível efeito que a matriz possa sofrer por um dos parâmetros seria confundido nas demais matrizes não justificando o estudo. Os resultados da análise estatística forneceram os gráficos de efeito que foram organizados na Figura 4. O modelo proposto explicou mais de 95% dos dados para todas as matrizes analisadas. Os valores dos efeitos de primeira, segunda e terceira ordem estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores dos efeitos observados para os parâmetros em estudo em função de matriz avaliada

Parâmetro	Efeito por matriz					
	1	2	3	4	5	6
A	0,0338	0,0274	0,00434	-0,01492	-0,0092	0,0236
B	0,0346	0,0223	-0,02774	-0,00530	0,3654	0,0231
C	0,0164	0,0405	0,01329	0,00578	-0,0234	0,0226
AB	-0,0174	0,0144	0,01839	0,01985	-0,0092	-0,0386
AC	0,0008	0,0024	-0,00994	0,01578	0,0446	-0,0072
BC	0,0336	0,0616	0,02284	-0,02875	-0,0234	-0,0064
ABC	0,0081	-0,0458	-0,01209	-0,00060	0,0446	0,0282

Legenda: – A) volume de HCl; B) Pré-calcinação, C) Volume de nitrato de magnésio, AB) interação entre os fatores A e B, AC) interação entre os fatores A e C, BC) interação entre os fatores B e C, ABC) interação entre os fatores A, B e C

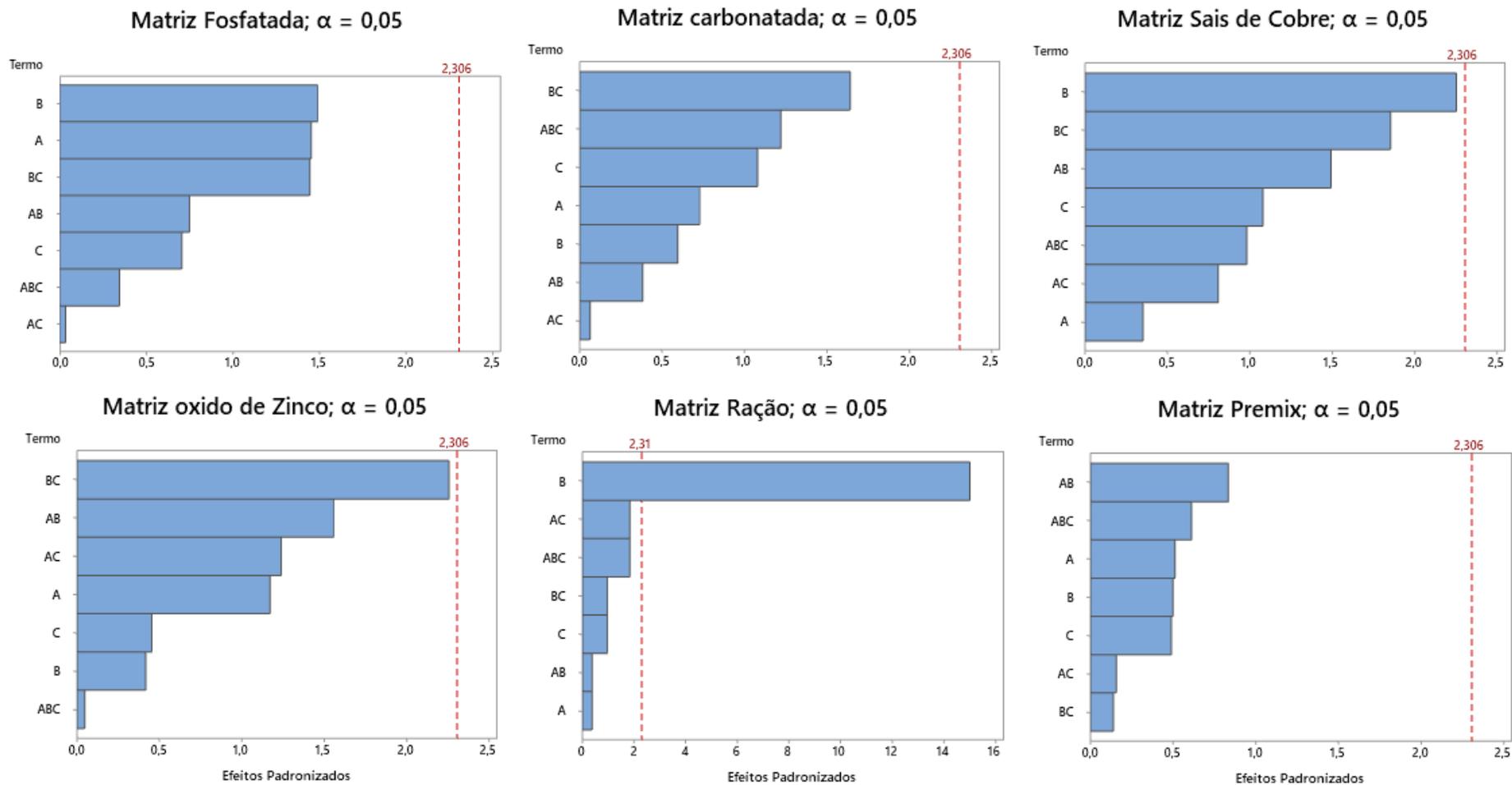


Figura 4 - Gráficos de efeito para a otimização do preparo das amostras – A) volume de HCl; B) Pré-calcinação, C) Volume de nitrato de magnésio, AB) interação entre os fatores A e B, AC) interação entre os fatores A e C, BC) interação entre os fatores B e C, ABC) interação entre os fatores A, B e C

Pela análise da Figura 4 observa-se que para o limite experimental estudado em um nível de 95% de confiança, a exceção da pré calcinação para a matriz de ração, todos os efeitos de primeira, segunda e terceira ordem não foram significativos. Os valores dos níveis foram definidos pela experiência prévia e com base na literatura e talvez, por isso, efeitos significativos não foram observados, por já se estar trabalhando em uma faixa de alta performance. Ainda assim, na busca da melhor condição de abertura da amostra, os efeitos de primeira ordem foram analisados.

Observando-se os valores dos efeitos na Tabela 9, nota-se que a maior parte dos efeitos de primeira ordem são positivos, ou seja, com o incremento proposto do nível baixo para o nível alto, temos um aumento do sinal analítico. Para o volume de ácido clorídrico o nível alto só gera efeito negativo para as matrizes de óxido de zinco e de ração. Contudo o valor do efeito negativo é muito baixo para a matriz de óxido de zinco e quase nulo para ração. Na Tabela 9 nota-se que o sinal analítico para óxido de zinco quase não se altera para todos os níveis estudados. O ácido age na degradação química da amostra e como as matrizes podem variar muito em sua composição, utilizar um volume maior é vantajoso para garantir a eficiência da digestão. Porém, é importante lembrar que o cloreto de arsênio (III) é volátil, dessa forma um volume muito grande de ácido pode levar a perdas do analito por volatilização. Como essa perda não foi considerável dentro dos níveis estudados, já que o sinal analítico se manteve estável, optou-se por trabalhar com o volume de 20 mL de HCl 50% (v/v) por acreditar que ele pode responder melhor às variedades amostrais.

No que se refere a pré calcinação das amostras em mufla por 16 h a 550°C, vemos que esse fator teve efeito significativo apenas para a amostra de ração. Esse resultado já era esperado pelo alto teor de material orgânico presente nesse tipo de amostra. A combustão na mufla ajuda na mineralização da amostra e, assim, na liberação do analito. Para as

demais matrizes vemos que os valores de efeito positivos ou negativos, pouco alteraram na qualidade dos resultados.

Como a utilização de mufla aumenta o tempo experimental, optou-se por realizar o procedimento de pré calcinação apenas em amostras de ração e em outras amostras recebidas com informação de teor orgânico maior de 20 % em massa, como no caso de premix de base orgânica.

Para o volume de nitrato de magnésio adicionado é possível verificar que apenas para a ração o efeito foi negativo, ao contrário do esperado. Considerando que a massa de amostra para essa matriz é maior, acreditava-se que um volume maior de nitrato de magnésio seria necessário. Entretanto, os fatores de interação de segunda ordem AC e de terceira ordem ABC, apesar de não significativos, foram expressivos de forma positiva, superando o fator isolado de primeira ordem C para a matriz ração o que justifica o uso do nível superior para essa matriz. Para as demais matrizes, optou-se por trabalhar com o nível inferior para este fator por economia de reagente.

5.4 Parâmetros da validação

5.4.1 Linearidade

O ajuste ao modelo linear para a explicação dos dados é buscado na maioria das vezes para análises univariadas. Fato que se explica pela facilidade de se trabalhar com o modelo tanto matematicamente quando em representações gráficas. Para a faixa de concentração estudada de 2,0 a 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ os resíduos (Figura 5) seguiram a distribuição normal, mostraram independentes e homocedásticos. Dessa forma a curva pode ser construída pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo a relação de concentração com a absorvância linear com um coeficiente de correlação de 0,9974

(Figura 6). No teste de resíduo da curva, todos os resíduos foram menores que 10% indicando um bom ajuste do modelo proposto com os dados experimentais.

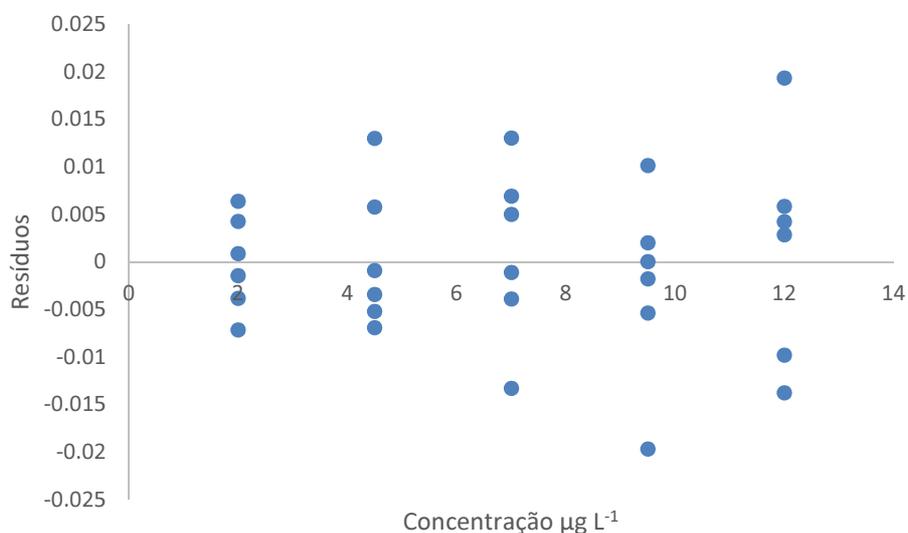


Figura 5: Gráfico de resíduos em função da concentração

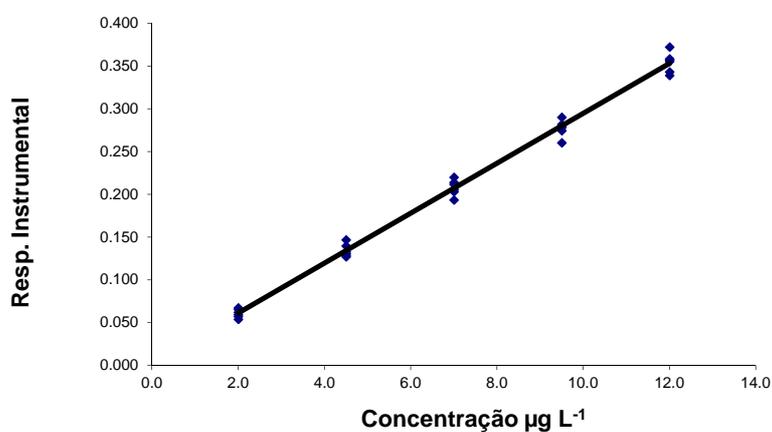


Figura 6 – Curva analítica para avaliação da Linearidade

5.5 Avaliação do Efeito matriz (curva de compatibilidade de matriz)

Em toda análise química sempre haverá efeito de interação matriz e analito, dizemos que há efeito de matriz significativo quando essa interação é forte o suficiente para interferir

no valor da grandeza mensurada. O efeito da matriz sobre o analito pode ser positivo, aumentando o valor da grandeza mensurada ou negativo, quando o valor é subestimado. Em análises quantitativas uma das formas de se verificar a existência de efeito significativo é pela comparação das curvas analíticas obtidas mensurando-se o analito na presença e na ausência da matriz. Algumas metodologias indicam primeiramente a comparação entre a curva em matriz e a curva em água ultrapura, contudo, de forma a tentar mitigar ao máximo a significância do efeito é de prática usual trabalhar-se com o que se chama curva de reagentes em comparação com a curva em matriz. A curva em reagente tem adicionada em si todos os reagentes e solventes adicionados a matriz durante a análise só não tem os componentes da matriz. Para este estudo comparou-se a curva de reagente com seis das sete matrizes avaliadas. Não foi realizado estudo com a matriz de óxido de magnésio já que todas as curvas apresentam grande concentração do metal uma vez que seu sal é adicionado na etapa de reação para a redução do As. A Tabela 10 apresenta os valores das inclinações e das interseções para todas as curvas avaliadas. A Figura 7 apresenta as curvas absorvância em função da concentração para todas as matrizes estudadas.

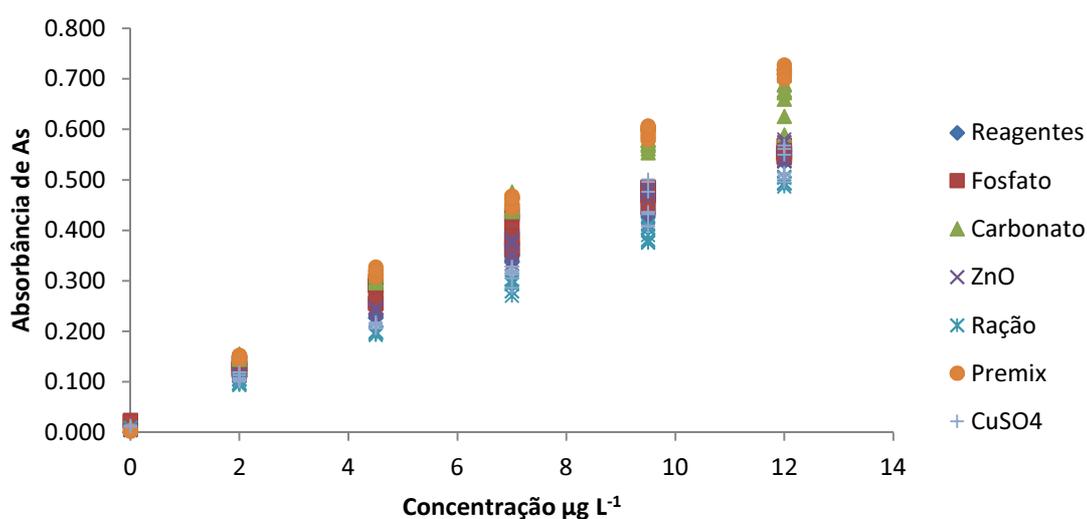


Figura 7: Curva analítica para as matrizes em estudo

Para a verificação da existência ou não do efeito de matriz primeiramente foi aplicado um teste F para verificar se as variâncias das inclinações e interseções da curva matrizada com a curva de reagentes eram homogêneas ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$). Como para todas as matrizes as variâncias não diferiram, procedeu-se com um teste T das médias para verificação de equivalência dos valores de inclinação e interseção das curvas. O valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ indicando que as médias não diferem estatisticamente a 95% de confiança, ou seja, não há efeito de matriz significativo no universo amostras verificado. Não existindo efeito de matriz significativo, pode-se utilizar a curva de reagentes para a quantificação do analito nas matrizes.

Tabela 10: Dados para a avaliação da existência de efeito de matriz significativo para as matrizes em estudo

		Fosfatada		Carbonatada		Sais de Cobre		Óxido de zinco		Ração		Premix	
		MATRIZ	ROTINA										
inclinação	Média	0,04318	0,04290	0,037963	0,038359	0,082743	0,082692	0,0045380	0,0045488	0,19842	0,19787	0,057798	0,057468
	Variância	$3,23 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-7}$	$2,66 \times 10^{-7}$	$3,18 \times 10^{-7}$	$2,44 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-9}$	$9,19 \times 10^{-9}$	$3,46 \times 10^{-9}$	$4,66 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$	$1,22 \times 10^{-7}$	$8,55 \times 10^{-8}$
	T _{tabelado} (95%)	2,31		2,31		2,31		2,31		2,31		2,31	
	t _{calculado}	0,79		1,16		0,07		0,21		0,48		1,62	
Interseção	Média	0,02780	0,02738	0,03225	0,02978	0,01357	0,01210	0,01803	0,01563	0,00937	0,01089	0,03308	0,03510
	Variância	$2,29 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-5}$	$2,82 \times 10^{-5}$	$2,21 \times 10^{-5}$	$9,15 \times 10^{-7}$	$3,95 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-7}$	$2,88 \times 10^{-6}$	$1,59 \times 10^{-6}$	$2,48 \times 10^{-6}$	$1,91 \times 10^{-6}$
	T _{tabelado} (95%)	2,31		2,31		2,31		2,31		2,31		2,31	
	t _{calculado}	0,14		0,88		0,68		1,37		1,24		2,16	
Conclusão		Não há efeito de matriz		Não há efeito de matriz		Não há efeito de matriz		Não há efeito de matriz		Não há efeito de matriz		Não há efeito de matriz	

5.6 Limite de Detecção e limite de Quantificação

Os valores encontrados para os limites de detecção e de quantificação estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de LD e LQ para As nas diferentes matrizes experimentais

	Fosfato	Carbonato	ZnO	CuSO ₄	MgO	Premix	Ração
LD (mg kg ⁻¹)	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
LQ (mg kg ⁻¹)	2,00	3,00	50,00	10,00	6,00	2,00	0,40

Um mix formado por três amostras brancas de cada matriz foi utilizado para determinação do limite de detecção de forma a se obter um valor único para todo o método. Devido à contaminação natural de algumas amostras o LD obtido foi ligeiramente elevado, estando abaixo dos valores de LQ para todas as matrizes, exceto para a ração. Contudo, mesmo com um limite baixo foi possível confirmar experimentalmente o valor de LQ para a matriz de ração e para todas as matrizes. O valor de LQ confirmado foi igual a um quinto do LMR na matriz conforme recomendado pelo guia de validação utilizado, exceto para a matriz de MgO, porque a amostra disponível para a fortificação apresentava concentração acima do LQ que seria testado, não permitindo a quantificação nesse mesmo nível. No estudo realizado por *Adamse e colaboradores* [42] foi evidenciado que alguns aditivos apresentam concentração acima de 20% do limite permitido, devido às formações geológicas ou aos processos de produção industrial.

Outra exigência do guia é que o primeiro ponto da curva corresponda ao valor de LQ para a matriz. Essa exigência foi confirmada para todas as matrizes.

5.7 Precisão

A repetitividade foi avaliada em dois níveis de concentração no LQ e no LMR para cada uma das matrizes. Os ensaios foram realizados em dois dias diferentes pelo mesmo

analista. Os valores de absorvância foram convertidos pelas curvas analíticas em valores de concentração para cada ponto. Foi então calculado o RSD de cada um dos níveis estudados. Esse valor foi dividido pelo RSD% calculado pela equação de Horwitz (equação 4), para de obter o valor de HORRAT_r.

$$\text{Equação 4: } \text{RSD}_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

onde C é a concentração (m/m) do nível avaliado expressa em potência de 10.

Os valores encontrados estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Valores de repetitividade por matriz para os valores de LQ e LMR

	Concentração (mg kg ⁻¹)	RSD _r (%)	RSD _(Horwitz) (%)	HORRAT _r
Fosfato	2,00	4,0	14,4	0,28
	10,00	4,7	11,3	0,24
Carbonato	3,00	2,6	13,6	0,20
	15,00	2,1	10,6	0,20
MgO	6,00	13,9	12,2	1,14
	20,00	4,0	10,2	0,40
ZnO	20,00	3,4	8,90	0,38
	100,00	5,3	8,00	0,67
CuSO ₄	10,00	5,4	11,3	0,48
	50,00	4,4	8,9	0,49
Premix	2,4	5,3	14,0	0,38
	12,00	3,2	11,0	0,29
Ração	0,4	11,3	18,4	0,62
	2,00	4,7	14,4	0,33

Pelos valores apresentados na Tabela 12, para todos os níveis os valores de HORRAT para a repetitividade foram menores que 2 e, portanto, satisfatórios segundo o

regulamento 333 de 2007 da comissão europeia [46]. Os maiores valores de RSD foram encontrados para os níveis baixos da ração e do óxido de magnésio. O primeiro se justifica por ser um valor muito baixo próximo do LD do método, já para o segundo o fato da amostra utilizada na fortificação ter nível de concentração muito próximo ao estudado (aproximadamente 4 mg kg^{-1}) faz com que os valores fltuem de forma mais considerável.

A precisão intermediária foi avaliada de forma semelhante. Nos cálculos foram acrescentados os valores obtidos por outros dois analistas em dois dias de análises diferentes. Os valores estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores para avaliação da precisão intermediária por matriz para os valores de LQ e LMR

	Concentração (mg kg^{-1})	RSD _r (%)	RSD _(Horwitz) (%)	HORRAT _r
Fosfato	2,00	8,90	14,41	0,62
	10,00	3,20	11,3	0,28
Carbonato	3,00	5,90	13,6	0,44
	15,00	5,90	10,6	0,56
MgO	6,00	9,80	12,21	0,81
	20,00	5,90	10,19	0,58
ZnO	20,00	7,20	8,80	0,81
	100,00	6,00	8,00	0,75
CuSO ₄	10,00	7,90	11,30	0,71
	50,00	5,00	8,90	0,56
Premix	2,4	7,30	14,02	0,38
	12,00	5,20	11,00	0,29
Ração	0,4	8,30	18,36	0,46
	2,00	8,40	14,41	0,59

Os valores encontrados para HORRAT da precisão intermediária foram todos menores que 2, indicando que o método tende a apresentar boa precisão intermediária.

5.8 Veracidade/Recuperação

Foram realizados ensaios de recuperação em matriz para verificação desse parâmetro para todas as matrizes. As análises foram realizadas em sextuplicata no LMR de cada matriz. Em paralelo foram realizadas participações em ensaios de proficiência (EP) organizados pelo BIPEA e pelo FAPAS para algumas das matrizes em estudos. Os resultados para recuperação estão apresentados na Tabela 14 e na Tabela 15 os valores das participações nos ensaios de proficiência.

Tabela 14: Resultados das análises de recuperação por matriz

Matriz	Média da recuperação (%)
Fosfato	96,7
Carbonato	92,3
ZnO	92,5
MgO	97,8
Ração	88,6
Premix	92,6
CuSO ₄	93,8

Tabela 15: Resultados das participações em Ensaio de Proficiência para As

Matriz	Resultado reportado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Resultados Esperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Z score	Provedor
Ração	< 400	327	Não fornecido	Fapas
Premix orgânico	914	1122	-0,86	BIPEA
Premix mineral	2471	2495	-0,04	BIPEA
MnSO ₄	209	255	-0,68	BIPEA
Premix mineral	6479	6714	-0,018	BIPEA

Todos os valores de recuperação foram satisfatórios (entre 80 e 110 %) assim como as participações em EP, todos os z scores ficaram entre -2 e +2, indicando resultado satisfatório no nível analisado. Verifica-se, contudo, que o método tende a reportar valores de recuperação sempre menores que 100%, provavelmente devido à perda de arsênio por volatilização. Na rotina analítica será sempre avaliada a recuperação de uma amostra de controle e os valores serão corrigidos em função da recuperação dessa amostra teste.

5.9 Robustez

A análise da robustez busca verificar se o método continua respondendo de forma satisfatória mesmo submetido a pequenas alterações no protocolo analítico. Os parâmetros avaliados foram escolhidos com base em possibilidades reais de alterações na rotina laboratorial. Para todas as matrizes foi verificado que o tempo de reação, de permanência na mufla, para a matriz de ração, e o tempo de digestão na chapa não apresentam efeito significativo a 95% para os valores estudados. A interação dos fatores também não apresentou efeito considerável. Indicando, assim, que o método proposto

apresenta resultados aceitáveis mesmo com essas alterações. As Tabelas 16 e 17 apresentam o modelo para o planejamento 2^2 e 2^3 respectivamente. Os gráficos de efeito estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

Tabela 16: Planejamento Experimental 2^2 completo para Robustez em diferentes matrizes de alimentação animal

Experimento	Tempo de digestão	Tempo de reação	Absorbância média das triplicatas de leitura para As					
			Fosfato	Carbonato	ZnO	MgO	CuSO ₄	Premix
1	-1	-1	0,8564	0,6376	1,2598	0,7341	0,6348	1,2116
2	1	-1	0,8247	0,5907	1,3006	0,6936	0,6074	1,1806
3	-1	1	0,8256	0,6063	1,2720	0,6983	0,6388	1,1987
4	1	1	0,8339	0,6210	1,2562	0,7132	0,6345	1,1898

Tempo de digestão: (-1) 30 min e (+1) 60 min;
Tempo de reação: (-1) 30 min e (+1) 60 min.

Tabela 17: Planejamento Experimental 2^3 completo para Robustez na matriz de ração animal

Experimento	Tempo de digestão	Tempo de reação	Tempo de mufla	Absorbância média das triplicatas de leitura para As
1	-1	-1	-1	0,6463
2	1	-1	-1	0,6637
3	-1	1	-1	0,6554
4	1	1	-1	0,6622
5	-1	-1	1	0,6603
6	1	-1	1	0,6688
7	-1	1	1	0,6526
8	1	1	1	0,6641

Tempo de digestão: (-1) 30 min e (+1) 60 min;

Tempo de reação: (-1) 30 min e (+1) 60 min

Tempo de mufla: (-1) 10h e (+1) 16h

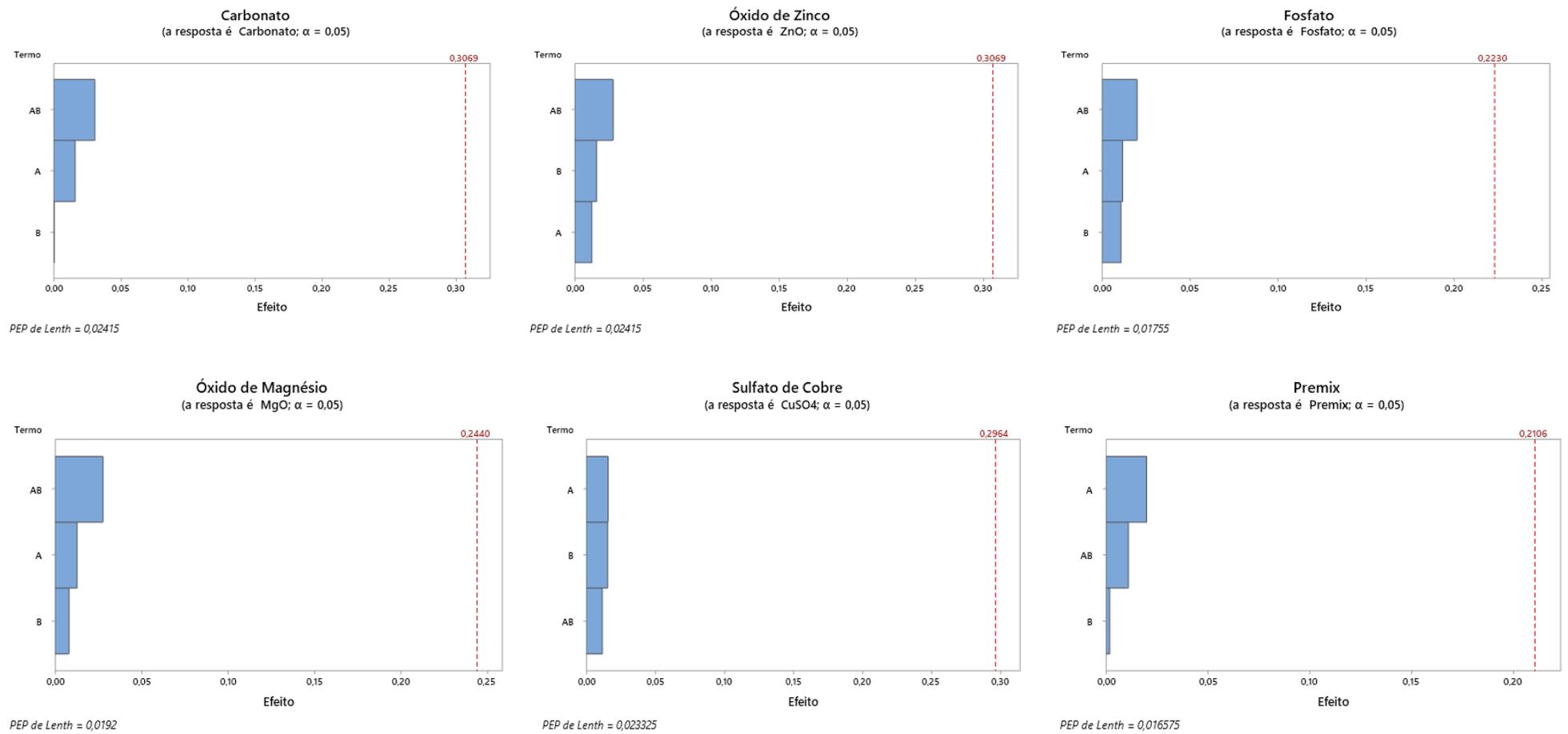


Figura 8 - Gráficos de efeito para a robustez para diferentes matrizes – A) Tempo de digestão ; B) tempo de reação e AB) interação entre os fatores A e B

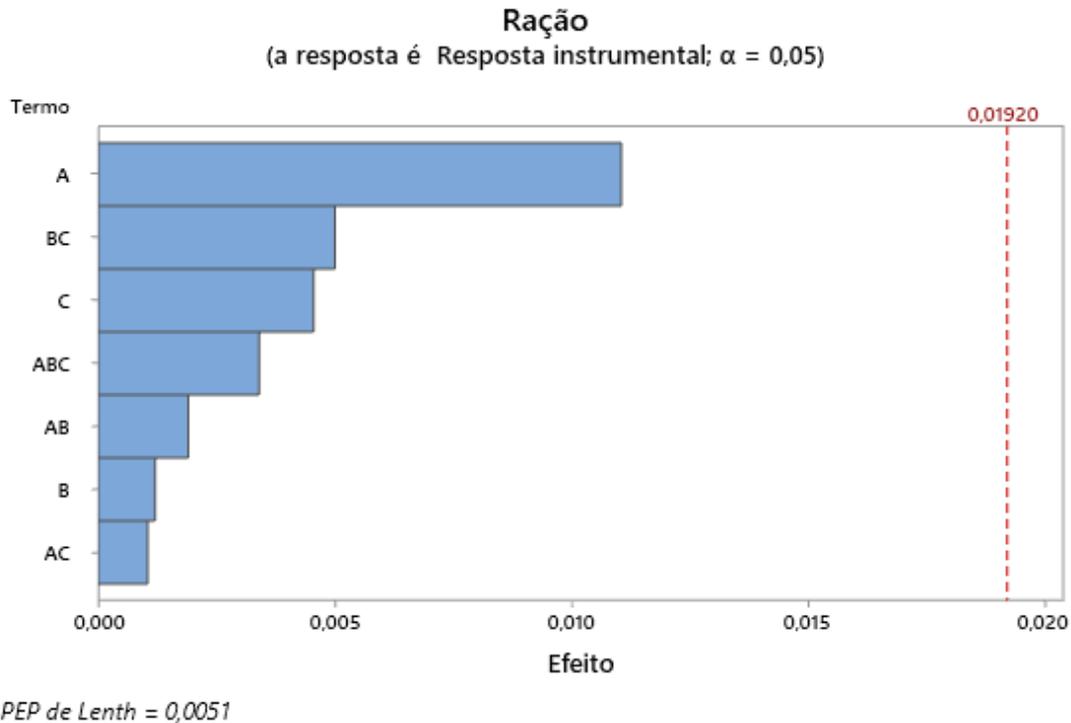


Figura 9 - Gráficos de efeito para robustez da ração – A) Tempo de digestão; B) Tempo de reação; C) Tempo de mufla; AB) interação entre os fatores A e B, AC) interação entre os fatores A e C, BC) interação entre os fatores B e C, ABC) interação entre os fatores A, B e C

Além dessa avaliação durante todo o desenvolvimento do método foram observados se alguns fatores poderiam afetar os resultados analíticos. O principal fator observado foi que o sinal analítico tende a cair em bateladas grandes (superiores a 40 amostras). Acredita-se que a queda do sinal ocorre pela decomposição do borohidreto de sódio em solução. Para aumentar a estabilidade do NaBH_4 adicionou-se 500 μL de solução de NaOH 50% (m/v) para cada litro de solução. Além disso nenhuma batelada analítica foi superior a 40 amostras.

5.10 Incerteza de medição no LMR

A incerteza é um dos parâmetros metrológicos mais importantes ligado à qualidade do resultado, pois é ela que permite a comparação com outros resultados e com os limites da legislação [45]. Os valores de incerteza para o LMR de cada matriz estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Incerteza padrão combinada e incerteza máxima para o LMR

Matriz	LMR (mg kg ⁻¹)	U no LMR (mg kg ⁻¹)	U max (mg kg ⁻¹)
Fosfatada	10	1,17	2,47
Carbonatada	15	1,71	3,06
Óxido de Magnésio	20	2,34	4,04
Sulfato cúprico	50	5,47	10,44
óxido de Zinco	100	17,26	20,01
Premix	10	1,30	2,47
Ração	2	0,24	0,48

As incertezas no LMR variaram entre 11 e 17% sendo que todas ficaram abaixo da incerteza máxima recomendada, conforme observado na Tabela 18.

As figuras de mérito avaliadas foram satisfatórias para a quantificação de As nas matrizes de alimentação animal avaliadas. A otimização experimental permitiu a definição de uma condição ótima para a análise de todas as matrizes por um método único de abertura e quantificação exceto por algumas particularidades do preparo da amostra para a matriz de ração. Dessa forma, ao final dos experimentos foi elaborado método analítico MET/LEI/PL/019 que está anexado a este trabalho no Apêndice 1.

6 Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para a determinação de arsênio em sete matrizes de alimentação animal, empregando digestão ácida em vaso aberto na presença de nitrato de magnésio, que evitou perdas significativas de As na forma de AsCl_3 . Como vantagem do método de digestão temos o baixo custo do procedimento e a possibilidade de abertura de um número grande de amostras em uma única batelada. Em geral, métodos em chapa tendem a ser demorados, contudo, no método proposto, com exceção da matriz de ração, o tempo de digestão ficou em torno de 30 min.

A alíquota de massa amostral utilizada se mostrou adequada para as análises. A técnica HG-AAS, amplamente aplicada na literatura para a quantificação de arsênio, mostrou-se adequada ao uso pretendido. Além disso, a técnica permitiu a identificação de As com elevada confiabilidade, utilizando uma ampla faixa de trabalho, com linearidade adequada e elevada sensibilidade.

A otimização do procedimento de digestão e dos parâmetros instrumentais foi realizada por meio de planejamentos de experimentos 2^3 e 2^2 completos. O método validado forneceu R^2 maiores que 0,999 e valores de resíduos, normalmente distribuídos, menores que 10%, indicando que o ajuste linear das curvas analíticas foi adequado. A precisão foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária, ambas em dois níveis de concentração. O maior valor do RSD intra-dia foi de 13,9% para a matriz de óxido de magnésio, devido, provavelmente à contaminação natural da amostra. A veracidade foi avaliada por recuperação (R %) no LMR de cada matriz. Os valores médios de R % ficaram na faixa de 88-98%, indicando que o método é capaz de emitir resultado com elevada exatidão para o LMR, fato que foi corroborado com as participações nos ensaios de proficiência sempre com resultados satisfatórios. Todos os valores de incerteza

apresentam conformidade com a legislação, pois mantiveram-se em concordância com o limite máximo de incerteza recomendado U_{max} .

7 - Referências bibliográficas

- [1] Rabelo, F. M. e Caldas, E. D. **Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants.** Environmental Research 151, 671–688, 2016.
- [2] ATSDR. **The priority list of hazardous substances that will be the candidates for toxicological profiles.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015.
- [3] Gontijo B., Bitencourt, F. **Arsênio – Uma revisão histórica** An. Bras. Dermatol. 80, 91, 2005.
- [4] Althobiti, R. A., Sadiq, N. W. Beauchemin, D. **Realistic risk assessment of arsenic in rice** Food Chemistry 257, 230–236, 2018.
- [5] Avelar A.C., Ferreira, W. M., Pemberthy, D., Abad, E., Amaral M.A. **Dioxins, furans, biphenyls, arsenic, thorium and uranium in natural and anthropogenic sources of phosphorus and calcium used in agriculture -** Science of the Total Environment 551–552, 695–698, 2016.
- [6] Molognoni, L.; Zarpelon, J.; Ploêncio, L. A. S.; dos Santos, J. N.; Daguer, H. **Different Approaches for Digestion, Performance Assessment and Measurement Uncertainty for the Analysis of Cadmium and Lead in Feeds -** Food Anal. Methods, Vol. 9, 12, 2016.
- [7] Monagalia, M. M.; Cumminsb, E., Bermejoa, R., Dalya, E. , Costelloc, D., Morrisona, L. - **Quantification and feed to food transfer of total and inorganic arsenic from a commercial seaweed feed** Environment International, 118,314–324, 2018.
- [8] Castro-González, N. P., Calderón-Sánchez, F., de Jesús, J. C., Moreno-Rojas, R., Tamariz-Floresd, J. V., Pérez-Satoa, M., Eutiquio Soní-Guillermoa, E. **Heavy metals in cow's milk and cheese produced in areas irrigated with waste water in Puebla, Mexico -** Food additives & contaminants: part B, vol. 11, 33–36, 2018.
- [9] INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019 (Publicado no DOU em: 25/04/2019)
- [10] Reis, V. A. T., Duarte, A. C. - **Analytical methodologies for arsenic**

speciation in macroalgae: A critical review, Trends in Analytical Chemistry 102, 170-184, 2018

[11] Díaz, O, Tapia, Y., Muñoz, O., Montoro, R., Vele, D., Almela, C. - **Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile**, Food and Chemical Toxicology 50, 744–749, 2012

[12] M. Mania, M. Rebeniak, T. Szynal, M. WojciechowskaMazurek, K. Starska, E. Ledzion, J. Postupolski **Total and inorganic arsenic in fish, seafood and seaweeds - exposure assessment** Roczn. Państwowego Zakładu Hig., 66, 203-210, 2015

[13] S. García-Salgado, M.Á. Quijano **Stability of toxic arsenic species and arsenosugars found in the dry alga Hijiki and its water extracts** Talanta, 128, 83-91, 2014

[14] S. Cui, J.-S. Na, N.-Y. Kim, Y. Lee, S.-H. Nam **An investigation on inorganic arsenic in seaweed by ion chromatography combined with inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry** Bull. Korean Chem. Soc., 34, 3206-3210, 2013

[15] J.M. Ronan, D.B. Stengel, A. Raab, J. Feldmann, L. O'Hea, E. Bralatei, E. McGovern **High proportions of inorganic arsenic in Laminaria digitata but not in Ascophyllum nodosum samples from Ireland** Chemosphere, 186, 17-23, 2017

[16] Y.J. Hsieh, S.J. Jiang **Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds** J. Agric. Food Chem., 60, 2083-2089, 2012

[17] D. Beauchemin, M.E. Bednas, S.S. Berman, J.W. McLaren, K.W.M. Siu, R. E. Sturgeon **Identification and quantitation of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace elements** Anal. Chem., 60, 2209-2212, 1988

[18] Dědina, J.; Tsalev, D. L. **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**. Wiley, New York, vol. 130, 1995.

[19] Kumar, A. R., Riyazuddin, P.. **Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry**. Trends in Analytical Chemistry, 29, 166-176, 2010.

[20] Takase, I.; Pereira, H.B.; Luna, A.S.; Grinberg, P. & Campos, R.C. **A geração química de vapor em espectrometria atômica**. Química Nova, 25, 1132-1144, 2002.

[21] Varejão, E. V. V., Bellato, C. R., de Mello, J. W. V., Fontes, M. P. F. **Otimização das condições de pré-redução do As(v) em extratos do método BCR para quantificação de As por HG-AAS** R. Bras. Ci. Solo, 33, 875-883, 2009

[22] Lemes, M. J. De L. **Avaliação de metais e elementos-traço em águas e sedimentos das bacias hidrográficas dos rios mogiguaçu e pardo, São Paulo**. 2001. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-05032002-101204/es.php>>

[23] Tavares, T. M.; Carvalho, F. M. **Avaliação de Exposição de Populações Humanas a Metais Pesados no Ambiente: Exemplo do Recôncavo Baiano**. Química Nova. v.15, n.2, 147-155, 1992.

[24] Castro, S. V. de. **Efeitos de Metais Pesados Presentes na Água Sobre a Estrutura das Comunidades Bentônicas do Alto Rio das Velhas-MG**. 2006. Disponível em: <<http://www.smarh.eng.ufmg.br/defesas/220M.PDF>>

[25] Cavalcante, D. D. **Estratégias analíticas para determinação de arsênio e selênio em amostras de alimentos empregando a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos**. Tese. Universidade Federal da Bahia, 2014

[26] Barra, C. M.; Santelli, R. E.; Abrão, J. J.; La Guardia, M. De. **Especiação de Arsênio - Uma revisão**. Química Nova, 23, 2000.

[27] Monagail. M Mac.; Cummins, E.; Bermejo, R.; Daly, E.; Costello, D.; Morrison, L. **Quantification and feed to food transfer of total and inorganic arsenic from a commercial seaweed feed** Environment International 118, 314–324, 2018

[28] Burguera, M.; Burguera, J. L.; Brunetto, M. R.; de la Guardia, M.; Salvador, A.; **Flow-injection atomic spectrometric determination of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) species by use of an aluminium-column arsine generator and cold-trapping arsine collection** Anal. Chim. Acta, 261, 105, 1991

[29] Niegel, C., Matysik, F.M., **Analytical methods for the determination of arsenosugars – a review of recent trends and developments.** Anal. Chim. Acta 657, 83-99, 2010.

[30] Abdul Qadir Shaha, Tasneem Gul Kazi, Mohammad Balal Araina, Jameel Ahmed Baiga, Hassan Imran Afridi, Ghulam Abbas Kandhroa, Sumaira Khana, Mohammad Khan Jamali **Hazardous impact of arsenic on tissues of same fish species collected from two ecosystem** Journal of Hazardous Materials 167, 511–515, 2009.

[31] USDA **Agricultural Projections to 2023**, Fevereiro de 2014.

[32] Randa A. Althobiti, Nausheen W. Sadiq, Diane Beauchemin **Realistic risk assessment of arsenic in rice** Food Chemistry 257, 230–236, 2018

[33] Ellen Ashmore, Sarah Molyneux, Seamus Watson, Geoff Miles & Andrew Pearson, **Inorganic arsenic in rice and rice products in New Zealand and Australia** Food Additives & Contaminants: Part B, 2019

[34] Caldas D, Pestana IA, Almeida MG, Henry FC, Salomão MSMB, Souza CMM **Risk of ingesting As, Cd and Pb in animal products in North Rio de Janeiro State, Brazil.** Chemosphere 164, 508–515, 2016

[35] L. S. Azevedo, I. A. Pestana, A. C. Meneguelli-Souza, B. Ramos, D. R. Pessanha, D. Caldas, M. G. Almeida, C. M. M. de Souza **Risk of exposure to total and inorganic arsenic by meat intake among different age groups from Brazil: a probabilistic assessment** Environmental Science and Pollution Research, Volume 25, 35471–35478, 2018

[36] Fateme Samiee, Mostafa Leili, Javad Faradmal, Zahra Torkshavand, Gholamreza Asadi **Exposure to arsenic through breast milk from mothers exposed to high levels of arsenic in drinking water: Infant risk assessment** Food Control 106 106669, 2019

[37] RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013

[38] Gonçalves, J.R., Gonçalves, R.M., Gonçalves, R.M., **Cadmio, Chumbo e Solubilidade do Fosforo em Suplementos Minerais Bovinos Comercializados em Goiás**. Rev. Proc. Quím. 4 (7), 69e71. Ano 4, 2010.

[39] Carvalho AM, César CLG, Fisberg RM, Marcioni DM **Meat consumption in São Paulo – Brazil: trend in the last decade**. PLoS One 9, e96667, 2014

[40] Avegliano RP, Maihara VA, Silva FF **Development of the food list for Brazilian total diet study**. Food Sci Technol 35, 207–212, 2015

[41] Alltech, 2015. **Global Feed Survey 2015**. Disponível em: <https://www.alltech.com/sites/default/files/global-feed-survey-2015.pdf>

[42] P Adamse, H.J. (Ine) Van der Fels-Klerx, Jacob de Jong **Cadmium, lead, mercury and arsenic in animal feed and feed materials - trend analysis of monitoring results** Food Additives & Contaminants: Part A, 2017

[43] Ofício-Circular nº 3/2017/CPA/DFIP/MAPA/SDA/MAPA de 23 de maio de 2017

[44] Oliveira, E., **Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 14, p. 174-182, 2003

[45] BRASIL, **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011

[46] CE, 2006a. **Regulamento (CE) Nº 333/2007 da Comissão de 23 de março de 2007**. Jornal Oficial da União Europeia, p. L88/29-L88/38, 2007.

[47] C. Cerveira, D. Pozebon, D. P. de Moraes; J. C. S. de Fraga **Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS)** Analytical Methods, 7, 4528–4534, 2015

Apêndice – Método de Análise

Método Submetido a acreditação sendo usado na rotina do LFDA-MG

(MET/LEI/PL/019)

1.0 Objetivos e Alcance

Detectar e quantificar resíduos de arsênio (As) em amostra de alimentos para animais por Espectrometria de Absorção atômica com geração de hidreto – HG-AAS.

2.0 Fundamentos

O método fundamenta-se na digestão de amostras em vaso aberto de cerca de 1,0000 g de amostra de alimentação animal inorgânica ou 5,0000 g de alimentos orgânicos com 20 mL de ácido clorídrico 50 % (v/v) na presença de nitrato de magnésio com pré-calcinação em mufla para amostras orgânicas. O digerido é filtrado e avolumado com água ultra pura para 100,00 mL em balão volumétrico. Uma alíquota do digerido é colocada para redução do As (V) para As (III), na presença de KI e ácido ascórbico por trinta minutos. Ao final a amostra é avolumada para 10 mL. As leituras são realizadas em no equipamento de absorção atômica por geração de hidreto.

3.0 Reagentes, padrões, materiais e insumo

3.1 – Reagentes

- Solução de ácido Clorídrico 50% (v/v) e 10% (v/v)
- Água ultrapura (Resistividade > 18,2 MΩ.cm)
- Solução de nitrato de magnésio 50% (m/v)
- Solução composta de KI 5% (m/v) e Ácido ascórbico 5% (m/v)
- Solução de NaBH₄ 0,2% (m/v)

3.2 – Padrões

- Material de referência de Arsênio (1000 mg L^{-1})

3.3 – Materiais

- Ponteiras para micropipeta
- Balões volumétricos calibrados de 25,00 mL
- Balões volumétricos de 100,00 mL
- Proveta de 50,0 mL
- Balão volumétrico de 1000,00 mL
- Tubos graduados tipo falcon de 15,0 mL

3.4 – Insumos

- Amostras brancas, materiais de referência e/ou amostras naturalmente contaminadas
- Argônio analítico 5.0

4.0 Equipamentos

- Balança analítica com resolução de pelo menos 0,1 mg
- Micropipetas de volume variável de 100, 200, 1000 e 5000 μL
- Capela de Exaustão
- Chapa de aquecimento
- Espectrômetro de Absorção Atômica por geração de hidreto AAnalyst 400
- Sistema de injeção em fluxo FIAS 400

- Lâmpada de catodo oco ou de descarga de elétrons de

5.0 Precauções analíticas

- A água utilizada em todas as etapas da análise incluindo o preparo de solução deve ser ultrapura
- Todo o material utilizado, com exceção de ponteiros novas, deve ser lavado com detergente neutro, enxaguado com água ultrapura, imerso em banho ácido por pelo menos 4h e enxaguado novamente por pelo menos 3 vezes com água ultrapura.
- Identificar tubos, béqueres e outros itens de ensaio
- Manusear ácidos e soluções perigosas na capela de exaustão.
- Deixar a alíquota reagir por 30-60 min
- Não deixar a amostra na mufla por mais de 16h

6.0 Procedimentos

Durante a análise, preencher o formulário FOR/LEI/PL/017 com todas as informações pertinentes, permitindo a rastreabilidade das análises.

6.1 – Preparo de soluções reagentes

As soluções reagentes devem ser preparadas, identificadas, armazenadas e registradas conforme POP/LEI/PL/006. As soluções reagentes têm validade de 6 meses a partir da data de seu preparo (NT 06/2011 – LEI/LANAGRO-MG). As soluções podem ser preparadas em quantidades diferentes das expostas abaixo, desde que se mantenha a concentração das mesmas.

6.1.1 – Solução de ácido clorídrico 10% (v/v)

Medir em uma proveta 100 mL de ácido clorídrico ultrapuro ou purificado e transferir para balão volumétrico de 1000,00 mL com cerca de 500,00 mL de água ultrapura. Completar o volume do balão com água ultrapura.

6.1.2 – Solução de ácido clorídrico 50% (v/v)

Medir em uma proveta 500 mL de ácido clorídrico ultrapuro ou purificado e transferir para balão volumétrico de 1000,00 mL com cerca de 500,00 mL de água ultrapura. Completar o volume do balão com água ultrapura.

6.1.3 – Solução de $Mg(NO_3)_2$ 50% (m/v)

Medir a massa de 500g de nitrato de magnésio PA e solubilizar com 700 mL de água ultrapura transferir para balão volumétrico de 1000,00 mL. Completar o volume do balão com água ultrapura.

6.1.4 – Solução Composta de iodeto de potássio KI (5% m/v) e ácido ascórbico (5% m/v)

Medir a massa de 5g KI e 5g de $C_8H_8O_6$, solubilizar com 50 mL de água ultrapura transferir para balão volumétrico de 100,00 mL. Completar o volume do balão com água ultrapura. Essa solução deve ser preparada **IMEDIATAMENTE ANTES DO USO E SUA VALIDADE É DE 1 DIA.**

6.1.5 – Solução de borohidreto de sódio ($NaBH_4$ 0,2% m/v)

Medir a massa de 1g de $NaBH_4$, solubilizar com 100 mL de água ultrapura transferir para balão volumétrico de 500,00 mL. Adicionar 500 μ L de solução de NaOH

50% (m/v). Completar o volume do balão com água ultrapura. Essa solução deve ser preparada IMEDIATAMENTE ANTES DO USO E SUA VALIDADE É DE 1 DIA.

6.2 – Preparo de Solução Padrão

As soluções padrão devem ser preparadas, identificadas, armazenadas e registradas conforme descrito no POP/LEI/PL/004.

6.2.1 – Solução padrão de adição de arsênio (As 0,5 mg L⁻¹)

Pipetar exatamente 25 µL da solução estoque de As (1000 mg L⁻¹), transferir para balão volumétrico calibrado de 50,00 mL e completar o volume com água ultrapura.

6.2.2 – Solução padrão de adição para a recuperação de arsênio (As 10 mg L⁻¹)

Pipetar exatamente 100 µL da solução estoque de As (1000 mg L⁻¹), transferir para balão volumétrico calibrado de 10,00 mL e completar o volume com água ultrapura.

6.2.3 – Soluções padrões de uso para a curva de calibração de As

Preparar seis soluções padrões de 0 µg L⁻¹, 2,0 µg L⁻¹, 4,5 µg L⁻¹, 7,0 µg L⁻¹, 9,5 µg L⁻¹ e 12,0 µg L⁻¹ de As pipetando exatamente 0 µL, 100 µL, 225 µL, 350 µL, 475 µL e 600 µL da solução padrão de adição de arsênio (As 0,5 mg L⁻¹) (Item 6.2.1) e transferindo para balões volumétrico calibrados de 25,00 mL. Acrescentar em cada balão 2 mL da Solução de ácido clorídrico 50% (v/v) (item 6.1.2) e 3,75 mL da Solução Composta de iodeto de potássio KI (5% m/v) e ácido ascórbico (5% m/v) (item 6.1.4) Deixar reagir pelo mesmo tempo das amostras 30-60 minutos. Completar o volume do balão com água ultrapura.

6.3 – Digestão das amostras

6.3.1 – Cominuir as amostras previamente e passar em peneira de 0,25 mm.

6.3.2 - Medir, em Erlenmeyer de 125 mL, a massa de $1,0000 \pm 0,0100$ g de cada amostra a ser analisada. Para amostras de ração e de premix orgânico medir em cadinho de borossilicato a massa de $5,0000 \pm 0,0500$ g.

6.3.3 – Medir a massa de $1,0000 \pm 0,0100$ g de um material de referência certificado, material de referência ou de amostra naturalmente contaminada para servir de controle interno. Não existindo essas opções esse passo pode ser desconsiderado. Caso o material seja amostra de ração ou premix orgânico a massa deve ser de $5,0000 \pm 0,0500$ g.

6.3.4 – Medir $1,0000 \pm 0,0100$ g de duas amostras da matriz branca de maior representatividade da batelada disponível. Uma será utilizada como branco e a outra será fortificada para estimar a recuperação da batelada. Caso o material seja amostra de ração ou premix orgânico a massa deve ser de $5,0000 \pm 0,0500$ g.

6.3.5 – A recuperação deverá ser estimada em um dos três níveis conforme descrito no POP/LEI/PL/009. Verificar qual o nível avaliado nas duas bateladas anteriores e utilizar um nível diferente. As alíquotas da solução 6.2.2 devem ser adicionadas em acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 – Valores das alíquotas para adição na recuperação para os diferentes níveis

Matriz	Analito	Nível Inferior		Nível Intermediário		Nível Alto	
		Concentração (mg kg ⁻¹)	Alíquota (mL)	Concentração (mg kg ⁻¹)	Alíquota (mL)	Concentração (mg kg ⁻¹)	Alíquota (mL)
Fosfatos e algas Marinhas	As	2	0,2	10	1	15	1,5
Calcários, carbonato de cálcio, carbonato de cálcio e magnésio e conchas marinhas calcárias	As	3	0,3	15	1,5	22,5	2,25
Óxido de Magnésio, carbonato de magnésio	As	6	0,6	20	2	30	3
Sulfato de Cobre penta-hidratado, carbonato de cobre, cloreto e tricloreto de dicobre, carbonato de ferro	As	10	1	50	5	75	7,5
Óxido d zinco, oxido de manganês e óxido de cobre	As	20	2	100	10	150	15
Premix	As	2,4	0,24	12	1,2	18	1,8
Ração	As	0,4	0,2	2	1	3	1,5

6.3.5 – Adicionar em cada Erlenmeyer 1,0 mL de solução de nitrato de magnésio 50%, para as amostras que foram medidas em 5,0 gramas adicionar 4,0 mL de solução de nitrato de magnésio 50%.

6.3.6 – Para as amostras em erlenmeyer adicionar 20 mL de solução de ácido clorídrico 50% (v/v) e aquecer as amostras em chapa por 30-60 min.

6.3.7 – Para as amostras de ração e premix orgânico, deixar em chapa até queima e após isso levar em mufla a 550°C por 10-16 horas. Resfriar até temperatura ambiente. Adicionar 20 mL de solução de ácido clorídrico 50% (v/v).

6.3.8 – Filtrar o digerido para balão volumétrico de 100,00 mL e avolumar com água ultrapura.

6.3.9 – Em um tubo de 15,0 mL adicionar 2 mL de solução de ácido clorídrico 50% (v/v) e 1,5 mL de solução Composta de iodeto de potássio KI (5% m/v) e ácido ascórbico (5% m/v). Adicionar uma alíquota da amostra digerida conforme quadro 2 e deixar digerir por 30-60 min.

Quadro 2 – Alíquotas para reação

Matriz	Alíquota (µL)
Fosfatos e algas Marinhas	1000
Calcários, carbonato de cálcio, carbonato de cálcio e magnésio e conchas marinhas calcárias	667
Óxido de Magnésio, carbonato de magnésio	500
Sulfato de Cobre penta-hidratado, carbonato de cobre, cloreto e tricloreto de dicobre, carbonato de ferro	200
Óxido de zinco, óxido de manganês e óxido de cobre	100
Premix	1000
Ração	1000

6.3.10 – Avolumar para 10 mL e realizar a leitura.

6.4 – Detecção e quantificação

6.4.1 – Otimizar o espectrômetro de absorção atômica conforme IT/LEI/PL/0015. Ajustar o sistema de injeção em fluxo com as soluções de borohidreto de sódio e de ácido clorídrico 10% 9v/v).

6.4.2 – Na opção de edição de métodos, programas a análise para leitura de absorbância de arsênio de acordo com os seguintes itens:

Espectrômetro:

- Wavelength = 193,7 nm
- Slit width = 2,7 mm

Sinal:

- Measurement = Peak Height
- Smoothing = 19 points

Parâmetros de leitura:

- Time: 15 s
- Delay time = 0s
- BOC time = 2 s
- Replicatas = 3

Operação:

- Cell temperatura = 900 °C

- Sample volume = 500 μ L
- Fluxo de gás: 80 mL/min
- Verificar o desempenho do equipamento a partir da determinação da absorbância do primeiro ponto da curva conforme IT/LEI/PL/030.

6.4.3 – Fazer a leitura de absorbância do branco analítico, dos pontos da curva e das amostras de forma aleatória. A curva analítica deve ser lida, aleatoriamente, três vezes ao longo da análise.

6.4.4 – Se necessário fazer diluição das amostras e realizar nova leitura. As replicatas de leitura não devem ter RSD superior a 10%. Caso isso ocorra repetir a leitura. Persistindo a variação o responsável pelo setor deve avaliar tecnicamente quanto a liberação do resultado.

6.5 Pontos críticos

6.5.1 Anotar o peso exato da amostra que será utilizado no cálculo das concentrações dos analitos;

6.5.2 Transferência quantitativa das amostras nas filtrações, para não ocorrer perdas no processo de transferência e conseqüentemente ocasionar um erro na análise;

6.5.3 Preparação de soluções padrões, utilizando micropipetas calibradas, balões volumétricos calibrados e padrões certificados.

6.5.4 Verificar sempre antes da análise o estado dos cadinho utilizados, caso apresentem trincas não utilizar.

6.5.5 Realizar sempre, antes da análise, a checagem da absorbância de P1.

6.5.6 Verificar se as lentes da célula de quartzo estão limpas.

6.5.7 Não ultrapassar o limite de 60 min nas etapas de digestão e reação.

7.0 Resultados

7.1 Critérios de aceitabilidade dos resultados

- Coeficiente de determinação (R^2) da curva de calibração: $> 0,995$.
- Recuperação é de 80 a 110%, conforme POP/LEI/PL/011.
- Resíduos dos pontos da curva de calibração não ser superiores a 10%.
- O valor encontrado para a amostra naturalmente contaminada, MR ou MRC utilizada estar dentro do valor real da amostras teste mais ou menos a sua incerteza.

7.2 Cálculo dos resultados

Transcrever os dados de absorbância integrada e concentração das soluções padrão de uso e das amostras na planilha PLN/LEI/PL/001. Avaliar o resultado do coeficiente de correlação (R^2) da curva de calibração e o teste de resíduos. Caso não esteja dentro do aceitável ($R^2 > 0,995$) ou os resíduos diferirem de 10% do valor medido, repetir a leitura da curva de calibração utilizando os mesmos padrões e, se ainda assim o problema não for resolvido preparar novos padrões para construção de uma nova curva de calibração. Repetir as leituras das amostras com a nova curva. Se estiver adequado, terminar o preenchimento da planilha.

A planilha ajusta os dados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) ou Ponderados (MMQP) conforme os dados sejam homo ou heterocedásticos, calcula o fator de recuperação do dia (caso o resultado de recuperação não esteja dentro do aceitável, entre 80 a 110%, deve-se repetir a análise, observando criteriosamente o método e os pontos críticos) e corrige os cálculos de acordo com a porcentagem de recuperação do dia; para resultados menores que o limite de quantificação emite-se o resultado NQ (não

quantificado). Além destes parâmetros a planilha calcula o valor de incerteza padrão associado ao resultado da análise através da abordagem top-down (conforme descrito no POP/LEI/PL/011) e o valor de incerteza máximo aceitável de acordo com o POP/LEI/PL/011.

Os resultados são calculados mediante correção da massa de amostra e da porcentagem de recuperação através da planilha PLN/LEI/PL/001 e lançados na PLN/LEI/PL/009, e em seguida lançados no sistema eletrônico LIMS.

Os parâmetros de desempenho do método estão apresentados no relatório de validação. Alguns desses parâmetros, estão apresentados no quadro 3.

Quadro 3 – Parâmetros e incertezas para o método de determinação de Cd e Pb
alimentos para animais

	Fosfato	Carbonato	ZnO	CuSO ₄	MgO	Premix	Ração
LD (mg kg ⁻¹)	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
LQ (mg kg ⁻¹)	2,00	3,00	50,00	10,00	6,00	2,00	0,40