

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Juliana Monteiro Bastos da Silva

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DO ARSÊNICO POR HPLC/ICP/MS EM ALIMENTOS
SEM GLÚTEN DERIVADOS DO ARROZ**

Rio de Janeiro

2014

Juliana Monteiro Bastos da Silva

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DO ARSÊNICO POR HPLC/ICP/MS
EM ALIMENTOS SEM GLÚTEN DERIVADOS DO ARROZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Josino Costa Moreira

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Silva, Juliana Monteiro Bastos da

Especiação química do arsênio por HPLC/ICP/MS em alimentos sem glúten derivados do arroz / Juliana Monteiro Bastos da Silva. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

77 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Josino Costa Moreira

1. Arsênico. 2. Contaminação de Alimentos. 3. Oryza sativa. 4. Controle de Qualidade. I.Título.

Chemical speciation of arsenic by HPLC/ICP/MS in non-gluten foods derived from rice.

Juliana Monteiro Bastos da Silva

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DO ARSÊNICO POR HPLC/ICP/MS
EM ALIMENTOS SEM GLÚTEN DERIVADOS DO ARROZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Dra Alicia Sanchez Ortega
Universidad del Pais Vasco, Espanha

Dr. Ricardo Erthal Santelli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra Silvana do Couto Jacob
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador, Doutor Josino Costa Moreira por toda a credibilidade em mim depositada, apoio profissional e por ser a peça fundamental no meu desenvolvimento.

A todos os meus colegas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e aos colegas do Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudo da Saúde do trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) pela excelente convivência profissional.

Aos colegas da Universidad del Pais Vasco (UPV) pela oportunidade de integrar seu grupo de trabalho e pelo exemplo de credibilidade científica e excelente relacionamento interpessoal dentro e fora do ambiente laboratorial, em especial ao Professor Doutor Ramon J. Barrio e a Doutora Alicia Sanchez Ortega pelo auxílio na execução da parte prática do projeto.

Ao Laboratório de Absorção Atômica (LAATOM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC RJ, representado pelo técnico Rodrigo Gonçalves, pelo valioso apoio nas análises de Arsênio total.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Analítico (LaDA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) representado pela equipe: Professor Doutor Ricardo Erthal Santelli, Professora Aline Soares Freire e técnico Bernardo Ferreira Braz, pelo valioso apoio no tratamento preliminar das amostras.

Ao Laboratório de Microbiologia de Produtos do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS pelo empréstimo do liofilizador.

Ao Laboratório de Contaminantes Inorgânicos do Departamento de Química do INCQS pela ajuda no tratamento preliminar das amostras e vivência laboratorial.

Aos amigos, professores, coordenadores e equipe do Programa de Pós Graduação em Vigilância sanitária do INCQS, especialmente às alunas e amigas Patrícia Condé de Lima e Rafaela Pinto da Costa por toda ajuda apoio, convivência e amizade nesses dois anos.

Aos amigos Rodrigo Espíndola Godoy e Mayara Garcia de Mattos Barbosa pela amizade indubitável e pela ajuda em diversos momentos.

As freiras e colegas da Residência Maria Imaculada de Vitoria-Gasteiz por serem uma família na ausência física da minha própria.

Aos meus familiares e amigos que compreenderam minhas ausências sem me deixar desanimar, em especial a Felipe Santana Bastos e Felipe Cavalcante de Oliveira.

Ao meu irmão Daniel Monteiro de Cerqueira e a sua forma de enfrentar os desafios desde pequeno me fazendo lembrar que não importa a idade, não podemos ter vergonha de admitir os erros e aprender com eles.

E finalmente, é imprescindível agradecer as pessoas que me dão suporte em todas as etapas da vida, meus pais Leticia Carvalho Monteiro e Helio Luiz Bastos da Silva. Eles são meus exemplos e meu porto seguro. Amo vocês.

“A Química é talvez a ciência que mais necessita de amigos.
Para fazê-los, tê-los e mantê-los basta a humildade de perceber
que você nunca vai conseguir saber tudo
e eles sempre poderão lhe ensinar alguma coisa.”

Après Flavio Leite

RESUMO

O arsênio (As) é um elemento químico importante para a saúde do homem sendo considerado como reconhecidamente carcinogênico para humanos. Está amplamente disseminado no ambiente e chega ao homem através das águas e dos alimentos. Dos alimentos de origem terrestre, o arroz tem significativa importância devido à sua capacidade de acumular o As em concentrações muito mais elevadas que o trigo ou o centeio e capazes de impactar a saúde dos consumidores. Os efeitos biológicos do As estão intimamente relacionados às suas formas químicas e a seus estados de oxidação (especiação química). Em geral seus compostos inorgânicos são mais tóxicos que os orgânicos e os sais de As (III) são mais tóxicos que os de As (V). Com a finalidade de sugerir um valor provisório, para a ingestão semanal máxima tolerável de As inorgânico, o Comitê Conjunto de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde/Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (JECFA/FAO/WHO) recomendou recentemente através do Codex Alimentarius o limite máximo permissível em arroz de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para As total ou inorgânico, valor também adotado pela ANVISA. De acordo com o relatório de Março de 2012 do Comitê do Codex de Contaminantes em Alimentos das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (JECFA/FAO/WHO), no Brasil faz-se apenas determinação de As total. Com o intuito de contribuir para suprir esta lacuna, este trabalho foi realizado. Para isso, estudou-se a aplicabilidade de um método de determinação da concentração de As total avaliando-se seu comportamento frente a 4 amostras certificadas de farinha de arroz. Os resultados obtidos, sempre superiores a 92% de recuperação, atestam a validade deste método. Em seguida, 24 amostras de produtos sem glúten, adquiridos no comércio foram analisadas e os resultados situaram-se entre 33 e 301 mg kg^{-1} . Das amostras analisadas, 2 encontram-se acima dos limites recomendados. Procedimento semelhante foi utilizado nos estudos da especiação quando avaliou-se 16 amostras adquiridas no comércio. Obteve-se resultados compatíveis com os relatados nos materiais certificados mas observou-se grande variabilidade (de 13 a 97%) quando o somatório das frações foram comparados às concentrações de As total mostrando significativos efeitos matriciais.

Palavras-chave: arsênio; alimentos sem gluten; especiação química do arsênio; concentração de arsênio total.

ABSTRACT

Arsenic is toxicologically, a very important chemical element. It is classified as group 1 carcinogen by the IARC. This element is widely dispersed on the environment and it can reach the man through ingestion of contaminated water or food. Among the terrestrial foodstuffs, rice is the most important since it can concentrate As from the soil at levels sufficient high to impact the human health. The biological effects of this element are dependent of its chemical forms (speciation). It is know that in general, the inorganic forms are much more hazardous than the organic ones. In order to prevent any health effects caused by ingestion of As contaminated food, the Codex Alimentarius, published by JEFCA/WHO/FAO, recently recommended as maximum allowed intake of As via rice as 300 mg.kg⁻¹. The Brazilian Health Authority (ANVISA) also recommends this value. According to the “Proposed draft maximum levels for arsenic in rice” published by the Codex Alimentarius Commission entitled published in March 2012, in Brazil only the concentration of total arsenic is measured. In order to contribute to fill this gap this work was carried out. In this study the applicability of a selected methodology for total As determination was evaluated and 4 certified reference materials were used in this step. The obtained results were consistently > 95% of recovering assuring the good performance of this methodology. In advance, 24 samples of commercial products without gluten collected in the market were evaluated and the obtained results were from 33 to 301 mg.kg⁻¹ being 2 of those samples with concentration higher than the recommended value. Identical procedure was used on speciation studies. In this case, 16 samples were evaluated and the content of total As was compared with the summation of concentration of all As forms present. A great variability ranging from 13 to 97% was obtained showing great interference of the product matrix.

Keywords: arsenic speciation; non-gluten foods, total arsenic in non-gluten foods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do As pelo arroz.....	20
Figura 2 -	Representação esquemática dos processos de biotransformação do As no organismo humano e seus principais metabólitos.....	22
Figura 3 -	Representação dos efeitos bioquímicos, biológicos e doenças que a contaminação pelo As pode causar no organismo humano.....	24
Figura 4 -	Esquema geral dos estudos analíticos de especiação de As em alimentos	26
Figura 5 -	Classificação de métodos analíticos utilizados em estudos de especiação e suas principais características.....	27
Figura 6 -	Potencialidades analíticas de um sistema ICP-MS.....	28
Figura 7 -	Esquema representativo das soluções utilizadas no preparo das curvas analíticas para determinação da especiação do As.....	45
Figura 8 -	Gráficos das curvas analíticas referentes aos ensaios de As total no Brasil (A) e na Espanha (B).....	47
Figura 9 -	Gráfico quantidade de gordura rotulada x porcentagem de recuperação do As total.....	59
Figura 10 -	Cromatograma obtido com a extração ácida assistida por radiação de microondas do material de referência 1568b contendo as formas As (III), DMAe MMA. Solução extratora de ácido nítrico a 1%.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das amostras utilizadas nesse estudo e suas origens.....	38
Tabela 2 -	Programação utilizada para a extração das formas arsenicais em alimentos assistida por radiação de microondas.....	47
Tabela 3 -	Condições analíticas utilizadas na determinação da especiação de As nos alimentos.....	48
Tabela 4 -	Exemplo dos dados estatísticos obtidos em uma das curvas de calibração obtidas na especiação do As nos alimentos.....	51
Tabela 5 -	Resultados obtidos no estudo da repetitividade do método utilizado para a determinação da especiação do As em alimentos sem glúten.....	52
Tabela 6 -	Resultados obtidos no estudo da precisão intermediária do método utilizado para a determinação da especiação do As em alimentos sem glúten.....	52
Tabela 7 -	Resultados obtidos na análise do CRM 1568b sob diferentes condições de agitação: A – agitação por vortex; B – agitação Magnética e C – agitação manual.....	53
Tabela 8	Porcentagem de recuperação dos materiais de referência utilizados no estudo.....	54
Tabela 9	Resultados obtidos na determinação de As total em produtos sem glúten adquiridos no comércio do Brasil e da Espanha.....	55
Tabela 10	Resultados obtidos na especiação do As nos alimentos sem glúten selecionados (média de 2 determinações).....	57

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C-18	Octadecilcarbono
DC	Doença Celíaca
DMA	Ácido Dimetilarsênio
DMA (III)	Ácido Dimetilarsenioso
DMA (V)	Ácido Dimetilarsênico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura
GOT	Transaminase Glutâmica-Oxaloacética
GS	Glutaciona Reduzida
HPLC	Cromatografia a Líquido de Alta Resolução
ICP	Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS	Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
JECFA	Comitê Conjunto de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos
Lacen	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LaDA	Laboratório de Desenvolvimento Analítico
LD	Limite de detecção
LDH	Lactato Desidrogenase
LQ	Limite de quantificação
MMA	Ácido Monometilarsênio
MMA(III)	Ácido Monometilarsenioso
MMA(V)	Ácido Monometilarsênico
m/z	Massa/Carga
NIES	National Institute for Environmental Studies
NIST	National Institute of Standards & Technology
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
US EPA	United States Environmental Protection Agency

UPV	Universidade do País Vasco
PBS	Phosphate Buffered Saline
PUC-RJ	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
PROMAC	Programa Nacional De Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos Expostos ao Consumo Humano
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies Oxigenadas Reativas
RNS	Espécies nitrogenadas reativas
SAH	S-adenosilhomocisteína
SNVS	Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária
SRM	Standard Reference Material
SUS	Sistema Único de Saúde
Visa	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O ARSÊNIO	14
1.1.1. Características	14
1.1.2. Histórico	15
1.1.3. Toxicologia	16
1.2. CONTAMINAÇÃO	18
1.2.1. O Arsênio, a água e os alimentos	18
1.2.2. O Arsênio e o arroz	19
1.2.3. O Arsênio e alimentos sem glúten derivados do arroz.....	21
1.3. METABOLISMO DO As NO ORGANISMO HUMANO.....	22
1.4. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES ARSENAIS.....	25
1.4.1. Principais métodos analíticos utilizados para a determinação de arsênico total e de sua especiação em alimentos.....	25
1.4.2. O acoplamento HPLC/ICP-MS.....	29
1.5. ASPECTOS LEGAIS	30
1.6. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	32
1.7. JUSTIFICATIVA.....	34
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. EXPERIMENTAL	37
3.1. DETERMINAÇÃO DE AS TOTAL.....	42

3.1.1. Materiais de referência e padrões.....	42
3.1.2. Instrumentação	42
3.1.3. Procedimento.....	43
3.2. ESPECIAÇÃO DO As NOS ALIMENTOS.....	44
3.2.1. Materiais de referência e padrões.....	44
3.2.2. Instrumentação	46
3.2.3. Procedimento.....	46
3.3. VERIFICAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS ANALÍTICAS.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. ESTUDO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	50
4.1.1. Curvas Analíticas (ou de calibração).....	50
4.1.2. Limites de detecção e quantificação	51
4.1.3. Reprodutibilidade.....	52
4.2. GARANTIA DA QUALIDADE DOS RESULTADOS	54
4.3. DETERMINAÇÃO DE AS TOTAL	54
4.4. DETERMINAÇÃO DA ESPECIAÇÃO DO AS	56
4.4.1. Testes de extração ácida e aquosa assistidas por radiação de microondas.....	60
5. CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ARSÊNIO

1.1.1. Características

O Arsênio (As) é um semi-metal (metalóide) da família do nitrogênio. É encontrado no ambiente na forma sólida cristalina e coloração cinza-prateada. Quando exposto ao ar produz trióxido de Arsênio e beta Arsênio (SALGADO, 1996).

Isolado pela primeira vez em 1250, pode ser encontrado no ambiente, tanto através de fontes minerais naturais (água e solo) quanto por intermédio de ações antrópicas amplas, como o uso de herbicidas, inseticidas, pigmentos e medicamentos, além de constarem relatos de seu emprego em casos de envenenamentos (GORBY, 1988; JOLLIFFE, 1993; KUMARESAN E RIYAZUDDIN, 2001).

O As elementar é utilizado como agente de fusão para alguns metais, em processos de soldagem e na produção de cristais de silício e germânio. Em razão de suas propriedades também é utilizado, junto a outros metais, na produção de placas de chumbo de baterias elétricas e na fabricação de munições e ligas (SALGADO, 1996). Ainda quanto a sua utilização, os arsenitos são herbicidas, os arsenatos são inseticidas, os sulfetos produzem pigmentos e o arsenito de gálio (GaAs) é utilizado na fabricação de semi-condutores (SALGADO, 1996). Todas estas aplicações favorecem a exposição direta e indireta de todos os organismos vivos à contaminação(ATSDR, 2007).

Assim como os elementos químicos reativos, o As pode ser encontrado sob diferentes formas: inorgânicas como arsenito (As^{3+}) e arsenato (As^{5+}) e os organoarsênios que se apresentam principalmente nas formas metiladas, ácido monometilarsênio (MMA) e ácido dimetilarsênio (DMA). Dentre as espécies arsenicais, o arsenito é considerado 10 vezes mais tóxico que o arsenato, que é 70 vezes mais tóxico que as formas metiladas orgânicas (KUMARESAN E RIYAZUDDIN, 2001).

A biotransformação dos compostos arsenicais por microorganismos é comum e nestes casos são formadas espécies voláteis que contaminam a atmosfera que posteriormente retornam ao solo onde são adsorvidas, absorvidas, lixiviadas, reduzidas a arsinas, etc(ATSDR,

2007).

As espécies arsenicais, como o arsenato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$], arsenitos de cálcio, arsenato de sódio (Na_3AsO_4), arsenito de sódio (NaAsO_2), trióxido de Arsênio (As_2O_3), ácido Arsênio (H_3AsO_4) e o trissulfeto de Arsênio (As_2S_3), quando aquecidos, decompõem-se e emitem fumos arsenicais tóxicos, como a arsina (AsH_3) um gás incolor com odor de alho (SALGADO, 1996).

Sob o ponto de vista biológico, o As possui atividades díspares que vão desde uma possível essencialidade até a letalidade. Nesse amplo espectro funcional, compostos arsenicais foram utilizados como medicamentos durante longo tempo, sem que fossem reportados efeitos prejudiciais, quando corretamente aplicados. (APOSHIAN, 1997; SHIBATA, MORITA, FUWA, 1992; IARC/WHO, 1998).

1.1.2. Histórico

Analisando o As sob uma perspectiva histórica é possível observar uma alternância em relação a sua utilização, ora terapêutica ora agente tóxico. Relatos datados de 400 a.C descrevem seu emprego medicinal, enquanto que na Idade Média era conhecido como protagonista em eventos de envenenamentos (GONTIJO E BITTENCOURT, 2005).

Entre o final do século XIX e meados do século XX, as espécies arsenicais eram empregadas no tratamento de dermatoses tão numerosas quanto distintas. Eram ainda amplamente prescritos como tônicos e fortificantes. Contudo, já durante a Segunda Guerra Mundial, o As foi parar nos campos de batalha sob a forma de um gás letal vesicante, lacrimojante e altamente irritante para os pulmões denominado levisita (1,2-diclorovinildicloroarsina) (GONTIJO E BITTENCOURT, 2005).

Por suas características e histórico, o As está presente em todos os tratados de Medicina Legal e estudos frequentes de suas ações tóxicas (GONTIJO E BITTENCOURT, 2005).

1.1.3. Toxicologia

Sob o ponto de vista biológico, o As é um elemento químico que tem um comportamento paradoxal: é um constituinte normal dos organismos vivos (12º elemento químico em abundância no corpo humano) onde suspeita-se que participe de ações essenciais e, por outro lado, é considerado como um elemento reconhecidamente carcinogênico para humanos sendo classificado como pertencente ao Grupo 1, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer - IARC, um órgão especializado da Organização Mundial da Saúde (SHIBATA, MORITA, FUWA, 1992; APOSHIAN, 1997). Para complicar um pouco mais este espectro funcional, compostos arsenicais têm sido utilizados na medicina como medicamentos e o trióxido de arsênico, bem como outras drogas arsenicais, têm demonstrado eficácia no tratamento de leucemia promielocítica e outros tumores sólidos (EVENS, TALLMAN, GARTENHAUS, 2004; DILDA, HOGG, 2007).

No passado os habitantes dos Alpes mantinham o hábito de consumir o trióxido de arsênio com o intuito de aumentar sua capacidade respiratória facilitando seus deslocamentos pelas montanhas (PRZYGODA, FELDMANN, CULLEN, 2001).

As exposições crônicas e agudas ao As têm sido associadas com o aparecimento de cânceres, doenças cardiovasculares (hipertensão e aterosclerose) desordens neurológicas, distúrbios gastrointestinais, doenças renais e hepáticas, efeitos reprodutivos e outros (FAITA et al, 2013)

O homem está exposto ao As principalmente por via ambiental (contaminação atmosférica e hídrica) ou alimentar. Hoje em dia estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estão expostas ao As somente por via hídrica sem considerar as demais formas de exposição (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2004).

As ações biológicas do As estão intimamente ligadas às suas formas químicas e a seus estados de oxidação (sua especiação química). Em geral os compostos de As inorgânicos são mais tóxicos que os orgânicos e os sais de As (III) são mais tóxicos que os de As (V). Realmente as formas inorgânicas são cerca de 100 vezes mais tóxicas que as orgânicas e dentre as inorgânicas, o sais de As (III) são cerca de 60 vezes mais tóxico que os sais de As (V). As espécies trivalentes são mais reativas frente às macromoléculas que as pentavalentes (JAIN, ALI, 2000; SHARMA, SOHN, 2009).

No entanto esta regra não é absoluta e, de fato, existem várias exceções à mesma. Estudos mais recentes têm demonstrado que as formas MMA (III) e DMA (III) possuem maior toxicidade e genotoxicidade que seus compostos semelhantes As (V), MMA (V) e DMA(V) (LEVY et al., 2005; PAWLIK-SKOWRONSKA et al., 2004). Alguns estudos demonstram que as formas metiladas podem ser mais tóxicas que as formas inorgânicas originais tanto em ensaios “in vivo” quanto “in vitro” (PETRICK et al., 2001; STYBLO et al., 2002).

A eliminação deste elemento é realizada através dos rins, na forma inalterada ou após biotransformação. A metilação, durante algum tempo, foi considerada um mecanismo desintoxicação, que no caso de exposição a As inorgânico, pois o biotransformava em compostos menos tóxicos como o ácido monometilarsênio (MMA) e ácido dimetilarsênio ou cacodílico (DMA) (SALGADO, 1996).

As primeiras formas arsenicais a serem eliminadas pela urina após exposição são as inorgânicas, somente após cerca de 8 horas as espécies metiladas são preponderantes. A meia vida do As quando ingerido é de aproximadamente 10 horas e 50-80% é excretado em até 3 dias. A meia vida biológica dos compostos arsenicaismetilados é de aproximadamente 30 horas (SALGADO, 1996; KLAASSEN, 2008).

Devido aos elevados teores de queratina, rica em grupos sulfidrilas, o cabelo e as unhas refletem os níveis de exposição, principalmente, do As inorgânico. O As em unhas e cabelo tem sido usado como bioindicador para exposições prévias e presentes, enquanto na urina é um bom indicador para exposições recentes (SALGADO, 1996; KLAASSEN, 2008).

Efeitos subagudos, envolvendo principalmente os sistemas respiratório, cardiovascular, nervoso e hematopoiético são observados em exposições ocupacionais intensas. Alguns desses efeitos locais são: irritação, com danos nas mucosas nasais, laringes e brônquios, gangrena, alterações sensoriais, polineuropatias e leucopenia. Exposições prolongadas podem provocar perfuração do septo nasal, insuficiência pulmonar, traqueobronquite, tosse crônica e fibrose intersticial difusa (SALGADO,1996).

Além destes efeitos é importante mencionar alterações cutâneas como a queratose nas mãos e planta dos pés e hiperpigmentação, e renais como elevação dos níveis das enzimas transaminase glutâmica-oxaloacética(GOT) e lactato desidrogenase (LDH), hipertensão portal e, mais raramente, cirrose hepática. Em Taiwan, uma forma severa de arterioesclerose chamada de blackfootdisease – a doença do pé preto – também está sendo relacionada a altos níveis de As no solo e na água. (SALGADO, 1996; KLAASSEN, 2008).

Por outro lado, a simples presença do As em fluidos biológicos (sangue ou urina), por si só não significa que o organismo esteja doente. Este tipo de interpretação, embora comum é totalmente equivocado uma vez que outros determinantes de natureza pessoal (exposição a outros fatores de risco, temporalidade da exposição, etc.) e biológica também contribuem para o adoecimento e devem ser considerados(LAKIND et al., 2008).

1.2. CONTAMINAÇÃO

1.2.1. O Arsênio, a água e os alimentos

No Brasil, significativa contaminação ambiental por As foi encontrada na região de Nova Lima, Ouro Preto, Mariana e áreas circunvizinhas resultantes de extensiva exploração mineral. Neste contexto, estima-se que entre 390 e 3.900 ton. de As foram introduzidas no ambiente. Concentrações tão elevadas quanto 260-1710 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas nas águas do Rio da Velhas e de até 7000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em outros aquíferos(BUNDSCHUH et al., 2012).

De fato, elevadas concentrações de As foram detectadas em amostras de solos (concentrações entre 50–1000 mg/kg) e de águas (concentrações de até 350 $\mu\text{g L}^{-1}$) coletadas no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais. Com isto, vegetais recolhidos nesta região também evidenciaram concentrações elevadas de As. Amostras de inhame, por exemplo, apresentaram concentrações medias de 207 mg kg^{-1} e de feijões, 8,3 mg kg^{-1} (BUNDSCHUH et al., 2012a; MCCLINTOCK et al., 2012).

A água é a mais importante fonte de contaminação humana pelo As. Concentrações elevadas de As em águas particularmente das áreas reconhecidamente ricas neste elemento, tem sido utilizada como base para a grande maioria dos estudos toxicológicos. Ou seja, pouco se sabe sobre as contribuições de outras fontes de contaminação, como a alimentação, para o surgimento das doenças arsênio-induzidas.

Os organismos aquáticos são capazes de absorver, acumular e biotransformar o As. Na cadeia alimentar aquática, este elemento é incorporado como As inorgânico e metilado por microorganismos a MMA, DMA ou organo-açúcares. De fato, cerca de 90% do As encontrado em peixe e crustáceos marinhos está sob a forma orgânica, principalmente arsenobetaina, arsenocolina e DMA, e apenas 10% sob a forma inorgânica. Em peixes de água

doce, as espécies arsenicais predominantes são a arsenobetaina e a DMA. No entanto, muito pouco se conhece sobre a especiação química do As em peixes da água doce (RAHMAN, HASEGAWA, LIM, 2012).

Assim, a contaminação humana resultante da ingestão de alimentos de origem aquática não é tão significativa sob o ponto de vista toxicológico uma vez que as espécies mais abundantes nestes alimentos têm baixa toxicidade quando comparada com as outras formas inorgânicas. Entretanto esta ingestão contribui para a quantidade total de As ingerida e, em algumas situações onde há elevado consumo de produtos de origem aquática este somatório pode elevar os riscos de adoecimento (RAHMAN, HASEGAWA, LIM, 2012).

Isto ocorre não apenas com alimento de origem aquática, mas sempre que há ingestão de alimentos contaminados. Esta contaminação mesmo em níveis significativamente menores que o da água contaminada, representa uma via de exposição crônica capaz de contribuir para a produção de efeitos nefastos ao organismo humano (RAHMAN, HASEGAWA, LIM, 2012).

A concentração de As observada em alguns alimentos de consumo elevado é amplamente variável e dependente de inúmeros fatores. Em geral valores médios deste elemento (em ngg^{-1} de peso úmido) em peixes pode variar entre 160 e 2300 para peixes marinhos, entre 400 e 3000 para crustáceos (camarão), entre 20 e 500 para peixes de água doce, e entre 200 e 500 para o arroz (BATISTA, B.L. et al., 2011; SCHOOF et al., 1999).

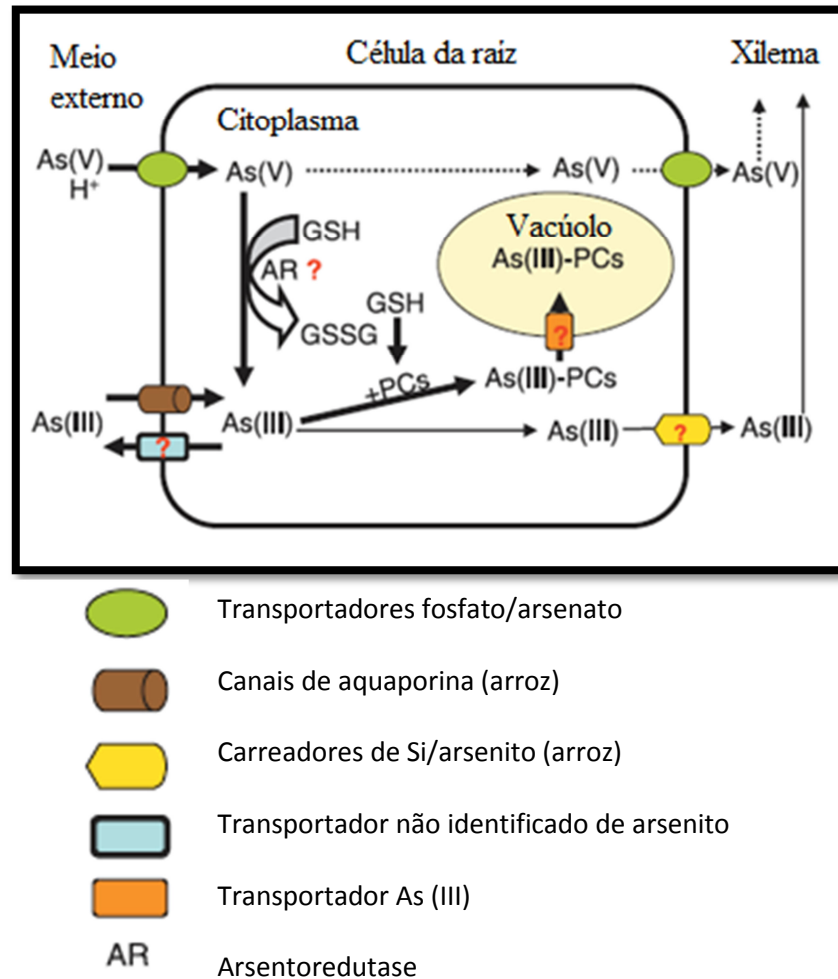
1.2.2. O Arsênio e o arroz

Dentre os alimentos de origem terrestre, o arroz tem significativa importância devido a seu amplo consumo e à sua capacidade de acumular este elemento em concentrações muito mais elevadas que o trigo ou o centeio, por exemplo. Esta propriedade está relacionada ao aumento da biodisponibilidade do As sob condições anaeróbicas em solos submersos onde o arroz é plantado (arroz de várzea). Neste caso tem-se um ambiente majoritariamente anaeróbico ou microaeróbico com característica redutora e o arsenato é reduzido a arsenito que é muito mais eficientemente absorvido pelo vegetal através do mecanismo de absorção do Si (ZHAO, MCGRATH, MEHARG, 2010; ZHAO et al., 2009).

O arsenato também é absorvido através dos transportadores de fosfato enquanto as formas metiladas MMA e DMA que não são abundantes nos solos são absorvidas em menores proporções através de um mecanismo ainda desconhecido. No interior do vegetal assim como

em ambientes redutores, grande parte do arsenato é reduzida a arsenito e transportado das raízes para as demais partes como pode ser visto na Figura 1 (ZHAO, MCGRATH, MEHARG, 2010; ZHAO et al., 2009)

Figura 1. Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do As pelo arroz.



Legenda: As larguras das linhas cheias representam as taxas de transferência relativas e as linhas pontilhadas indicam taxas baixas de transporte. O sinal de interrogação indica desconhecimento. GSSG - glutatona oxidada; GSH - glutatona; PC - fitoquelatinas.

Fonte: Adaptado da referência Zhao et al,2009.

Realmente o arroz, é um grão capaz de concentrar o As, principalmente sob a forma inorgânica sendo, além disto, um alimento de grande consumo que faz parte da dieta básica do

brasileiro. Este cereal contribui de maneira importante para a quantidade diária de As ingerida.

O arroz é um alimento que contribui com 70% da energia e 50% da quantidade de proteínas que o indivíduo necessita diariamente. Atualmente utilizado nas dietas isentas de glúten como um substituto ao trigo, este cereal é produzido por mais de cem países em quase todos os continentes, a exceção da Antártica (IRRI,1993; POTERA, 2007; SMITH et al, 2009; EFSA, 2009).

Existem muitas informações disponíveis na literatura científica sobre a concentração de As e suas formas químicas principais no arroz, mas muito pouco a respeito dessa concentração em alguns de seus produtos, como, por exemplo, nos alimentos nos quais o arroz substitui o trigo (BUNDSCHUH et al., 2012a; CUBADDA et al., 2010).

Com a finalidade de sugerir um valor provisório, para a ingestão semanal máxima tolerável de As inorgânico, o Comitê Conjunto de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde/Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (JECFA/FAO/WHO) recomendou recentemente através do Codex Alimentarius o limite máximo permissível em arroz de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para As total ou As inorgânico (CODEX ALIMENTARIUS, 2013). No Brasil, estudos recentes mostram uma concentração média de $222,8 \text{ ng g}^{-1}$ de As total, sendo que as formas inorgânicas, e DMA foram as formas mais abundantes (BATISTA et al, 2011).

1.2.3. O Arsênio e alimentos sem glúten derivados do arroz

O Glúten é definido com um complexo de proteínas insolúveis em água presentes no trigo, centeio, cevada, aveia e seus derivados. A procura pela produção e consumo de alimentos sem esse complexo em sua composição é crucial para a dieta de portadores da doença celíaca (DC) e outras alergias. A DC é uma doença genética que se caracteriza por uma alteração no intestino delgado e exige dos portadores uma dieta diferenciada pela ausência de glúten (LUDVIGSSON et al, 2012).

Atualmente, o arroz tem sido utilizado como uma alternativa ao uso do trigo, em diversos produtos, como biscoitos, barra de cereal e farinhas.

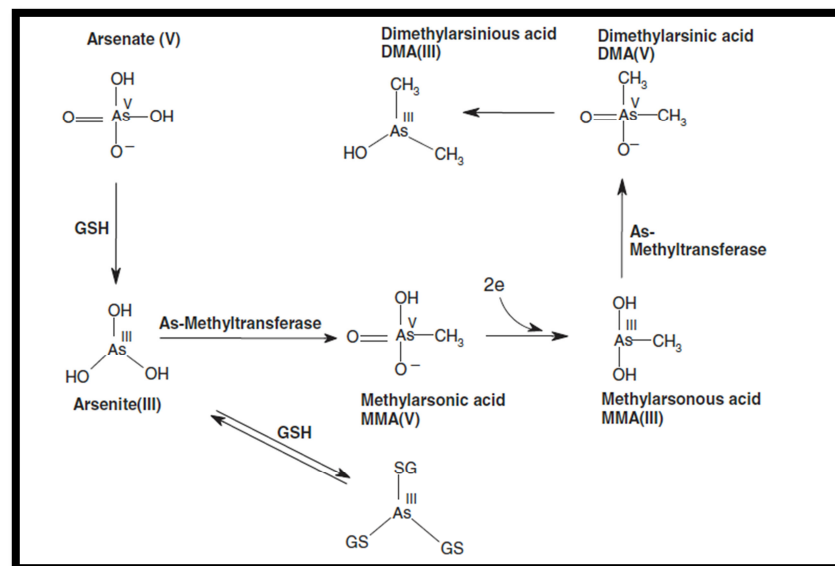
Estudos recentes apontam níveis excepcionalmente altos de As em alguns produtos derivados do arroz. A problemática destes alimentos é detectar o As, identificar e quantificar as espécies predominantes (JACKSON et al, 2012).

1.3. METABOLISMO DO As NO ORGANISMO HUMANO

Acredita-se que as patologias resultantes da contaminação humana pelo As advêm da produção endógena de espécies oxigenadas e nitrogenadas reativas (ROS)(FAITA et al, 2013; VENTURA-LIMA, BOGO, MONSERRAT, 2011).

Uma vez absorvido, os compostos do As sofrem biotransformações como representado na figura 2.

Figura 2: Representação esquemática dos processos de biotransformação do As no organismo humano e seus principais metabólitos.



Legenda: MMA(III) = ácido monometilarsenioso; MMA (V) = ácido monometilarsênico; DMA (III) = ácido dimetilarsenioso; DMA (V) = ácido dimetilarsênico; SAM = S-adenosilmetionina, SAH = S-adenosilhomocisteína, GS = glutatona reduzida

Fonte: Adaptado da referência Tseng, 2007 e Jomova et al, 2011.

O As não é capaz de se ligar firmemente às proteínas do plasma, sendo rapidamente removido do sangue, e amplamente distribuído aos tecidos (REN et al., 2011; VAHTER, 2002). Estima-se que entre 50 – 70% do As (V) absorvido é reduzido a As (III) ainda na corrente sanguínea através de uma reação não enzimática com a glutatona (GSH), ou enzimaticamente através de reação catalisada por arsenato-redutases.

Uma vez que o As (III) é mais tóxico que o As (V) esta etapa é considerada como uma bioativação.

No interior das células o arsenito é metilado oxidativamente a MMA ou DMA por um processo catalisado pela metiltransferase, através de um mecanismo que envolve a participação de inosina, de um tiocomposto e de um doador de grupos metila, como a S-adenosilmetionina. Estes derivados metilados são eliminados pela urina (VAHTER, 2002).

Alguns estudos mostram que a porcentagem de MMA eliminada pela urina é mais elevada em indivíduos que sofrem efeitos tóxicos causados pelo As, mas esta relação ainda não está totalmente elucidada (VAHTER, 2002).

Atualmente acredita-se que a metilação do arsenito pode produzir intermediários reativos trivalentes ainda mais tóxicos que o mesmo (HUBAUX et al., 2013; VAHTER, 2002).

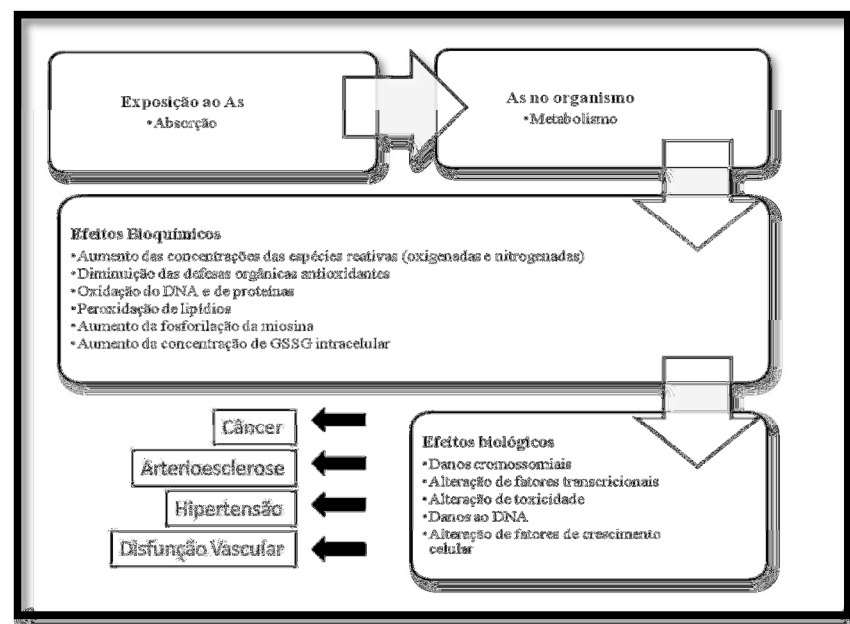
A capacidade individual do organismo humano em metabolizar os compostos arsenicais difere de indivíduo para indivíduo e seus efeitos biológicos dependem não apenas da quantidade ingerida, mas desta capacidade de metabolização e detoxificação. Realmente várias enzimas que participam deste processo, como a glutatona S-transferase (GST) e as catecol-O-metiltransferases (COMT) que são polimórficas. A frequência destes polimorfismos varia com a etnia (KELADA et al., 2003; LOFFREDO, C. A. et al., 2003).

O mecanismo relacionado à patogênia causada pelo As inorgânico é multifatorial e complexo e ainda não totalmente conhecido (ENGSTRÖM et al., 2007). Aparentemente envolve a indução de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) devido a ação de espécies oxigenadas e nitrogenadas reativas (ROS e RNS, respectivamente). O estresse oxidativo produzido por estes radicais, especialmente os radicais OH[•] e ONOO⁻ produzidos durante a biotransformação dos arsenicais, pode peroxidar lipídios, formar adutos e quebras nas moléculas de DNA além de aberrações cromossômicas, conforme mostrado na Figura 3 (KITCHIN, CONOLLY, 2010; RAHMAN, HASEGAWA, LIM, 2012).

Assim, a suscetibilidade individual às doenças relacionadas à contaminação arsenical difere grandemente entre indivíduos e esta diferença tem sido atribuída a variações interindividuais no metabolismo do As capazes de afetarem a retenção e a distribuição de seus

metabólitos tóxicos (FAITA et al, 2013). As patologias associadas à esta contaminação variam desde lesões na pele até vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares (hipertensão e aterosclerose) desordens neurológicas, distúrbios gastrointestinais, doenças renais e hepáticas, efeitos reprodutivos, etc.

Figura 3 – Representação dos efeitos bioquímicos, biológicos e doenças que a contaminação pelo As pode causar no organismo humano.



Fonte: Adaptado da referência KITCHIN, CONOLLY, 2010.

Sabe-se que o As e seus derivados, incluindo os metabólitos metilados, têm a capacidade de produzirem efeitos genéticos e epigenéticos. Entretanto há necessidade de aprofundar os estudos sobre os efeitos epigenéticos, sobre as relações dose-efeito e sobre os danos causados pela exposição crônica (ROSSMAN, KLEIN, 2011).

Adicionalmente os mecanismos pelos quais o As induz seus efeitos tóxicos, incluindo a formação dos cânceres, as disfunções cardiovasculares e metabólicas são pouco conhecidos.

1.4. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES ARSENICAIS

1.4.1. Principais métodos analíticos utilizados para a determinação de As total e de sua especiação em alimentos

A preocupação com a ingestão de As, um elemento reconhecidamente tóxico, pelo homem através dos alimentos não é recente. Entretanto, para se avaliar os riscos destas ações tóxicas potenciais sobre um organismo vivo é necessário conhecer-se as características toxicológicas e as concentrações das diversas formas químicas sob a qual este elemento está presente, uma vez que estes dois fatores estão intimamente relacionados. Assim sob o ponto de vista biológico, para se estimar eventuais efeitos de um dado elemento é muito mais importante conhecer suas formas químicas presentes e suas respectivas concentrações, ou seja, sua especiação química, que sua concentração total (INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2000).

Uma comprovação desta preocupação pode ser vista através do número de artigos publicados na literatura científica. Uma procura no site “Pubmed.com” (este site foi o escolhido por ser mais especializado em artigos que envolvam a saúde) mostra que nos últimos 10 anos, 2021 artigos foram publicados sob o tema determinação de As em alimentos; 311 sobre determinação de As em arroz e 26 tendo com o tema central a determinação do As em produtos de arroz. Substituindo-se o termo “determinação” por “especiação” estes números caem para 260 artigos em alimentos, 94 em arroz e apenas 6 em produtos de arroz. Tyson (2013) traz outros números provenientes de uma busca na web of science (TYSON, 2013).

Este mesmo *site* mostra que dentre as técnicas pesquisadas (sob os nomes voltammetry, atomicabsorption, ICP e ICP-MS) aquelas que envolvem o uso de plasma têm sido as mais empregadas para a determinação de As total nos três tipos de amostras procuradas e supra-citadas. Nos estudos de especiação, entretanto, a voltametria não tem sido utilizada e observa-se uma predominância da hifenação da cromatografia a líquido de alta resolução (HPLC) às técnicas de plasma, principalmente ao plasma indutivamente acoplado com um espectrômetro de massa (ICP-MS) que se destaca ainda mais na atualidade.

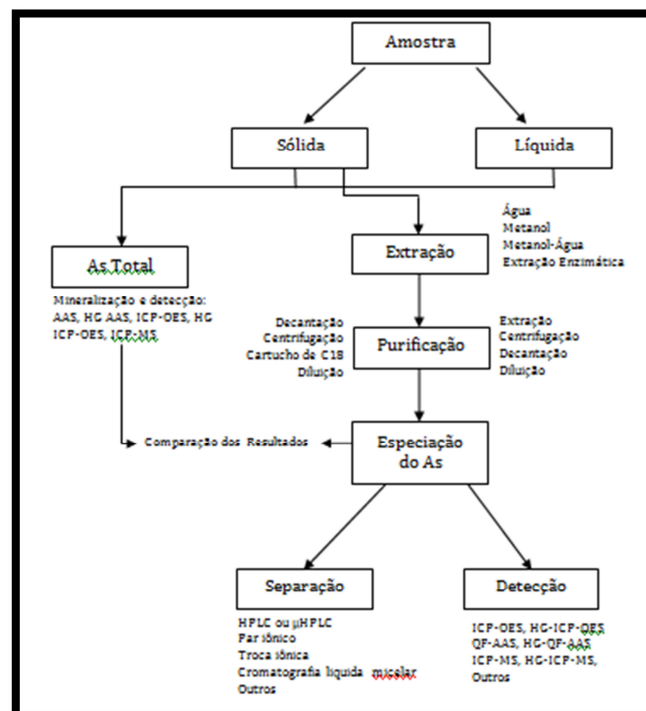
Excelentes revisões tem sido publicadas sobre as metodologias analíticas utilizada para esta finalidade como Barra, Santelli, laGuardia, (2000), Narukawa e

colaboradores(2008), Sanz, Muñoz-Olivas, Cámara (2005), Tyson(2013) e Llorente-Mirantes e colaboradores (2014).

Dentre estas revisões, Tyson(2013) apresenta de forma bastante didática uma discussão dos resultados e possíveis causas de erros na determinação de As e sua especiação em um material de referência do National Institute of Standards and Technology (NIST) - 1568a. Refere-se ainda a um teste de proficiência realizado na Europa por solicitação do Directorate General for Health and Consumers of the European Commission, the European Union Reference Laboratory for Heavy Metals in Feed and Food para a determinação de As total e As inorgânico em arroz, do qual participaram 98 laboratórios no teste de As total e 32 na avaliação de As inorgânico. Estes resultados são apresentados e discutidos por La Calle e colaboradores (2011). Neste teste foram utilizados métodos por ICP-MS (grande maioria); espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise por ativação por nêutrons. Este estudo concluiu que para a determinação de As total, todos os métodos e técnicas (extração aquosa, extração alcalina, digestão enzimática e extração ácida) utilizados produzem resultados comparáveis.

Em realidade os métodos analíticos utilizados em estudos de especiação de As em alimentos seguem o esquema geral apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema geral dos estudos analíticos de especiação de As em alimentos.

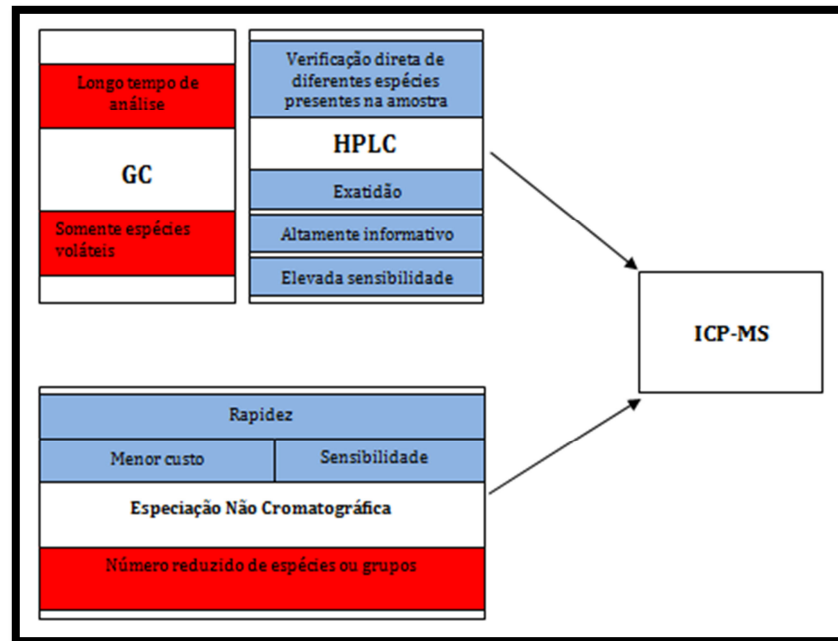


Fonte: Adaptado de Benramdane, Bressolle, Vallon, (1999).

Com finalidade estritamente didática, estes métodos podem ser divididos em 2 grandes grupos: aqueles que utilizam as cromatografias como etapa de separação e aqueles que utilizam outros procedimentos não cromatográficos (CERVERA, 2010).

Algumas vantagens e desvantagens destes dois tipos podem ser vistas na Figura 5.

Figura 5 - Classificação de métodos analíticos utilizados em estudos de especiação e suas principais características.



Fonte: Adaptado da referência Gonzalvez et al (2010).

Os métodos não-cromatográficos, utilizam etapas preliminares de separação como a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida, a geração seletiva de espécies voláteis (ex, hidretos), a destilação, a co-precipitação ou a separação por tamanho antes da determinação. Em geral para amostras líquidas uma etapa de “*clean up*” é necessária para eliminar proteínas e sais das matrizes uma vez que estas substâncias podem afetar a etapa de ionização (GONZALVEZ et al, 2010).

Para amostras sólidas orgânicas, faz-se inicialmente a digestão seguida de um procedimento de extração geralmente em conjunto com o uso de colunas de extração em fase sólida C-18 (GONZALVEZ et al, 2010).

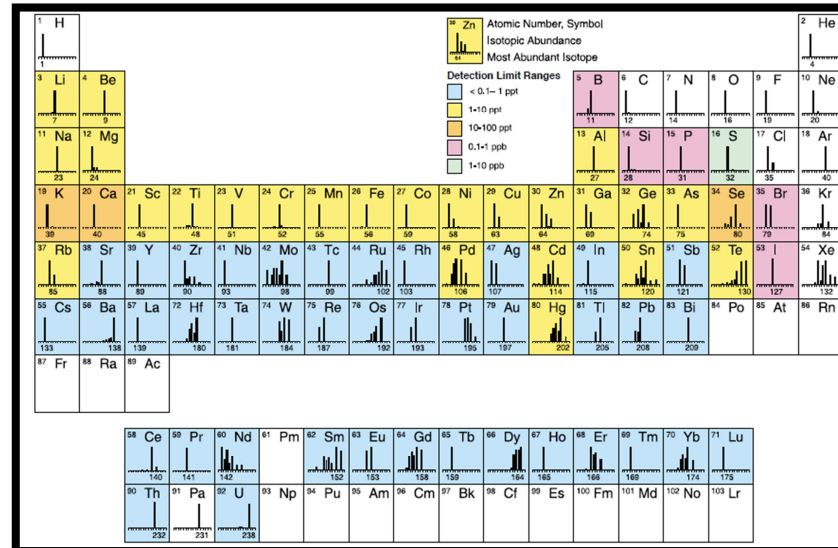
A determinação das concentrações pode ser feita através de técnicas eletroanalíticas (potenciometria, voltametria, etc), espectrofotometria molecular (Espectrofotometria na região do ultra-violeta e do visível ou quimioluminescência) ou atômica (Espectrometria de

absorção atômica – chama, vapor frio ou forno de grafite, ICP, etc.). Uma excelente revisão destas técnicas foi realizada por (GONZALVEZ 2010).

Hoje em dia a facilidade de acoplamento de sistemas cromatográficos, especialmente a HPLC aos sistemas de detecção, o que diminui consideravelmente o tempo de análise e a manipulação das amostras, fez com que as técnicas não cromatográficas perdessem importância nas análises de rotina quando comparada às hífenadas. Atualmente a metodologia mais utilizada nos estudos de especiação envolve o uso de um sistema cromatográfico acoplado ao ICP e a um sistema detetor de massas (por exemplo, Cromatografia em fase gasosa ou HPLC/ICP/MS). (JAMES et al, 2008).

Apesar do seu alto custo de aquisição, o sistema HPLC/ICP-MS apresenta as melhores sensibilidade e seletividade dentre as técnicas disponíveis para estudos do As, podendo detectar concentrações tão baixas quanto $0.0006 \mu\text{gL}^{-1}$ em amostras líquidas ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ em sólidos (TYSON, 2013). Entretanto outras formas de acoplamento são também utilizadas.

Figura 6 - Potencialidades analíticas de um sistema ICP-MS.



Legenda: As cores representam os intervalos dos limites de detecção, os traços representam os isótopos mais abundantes e o número representado abaixo, a massa isotópica mais utilizadas na análise quantitativa.

Fonte: Perkin Elmer Technical note, ICP Mass Spectrometry, disponível em http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf e consultado em 28/01/2014.

1.4.2. O acoplamento HPLC/ICP-MS

O sistema cromatográfico mais utilizado é a cromatografia a líquido tradicional onde as separações se baseiam na distribuição das espécies entre duas fases líquidas; uma estacionária e outra móvel. Este tipo de cromatografia pode ser dividido em dois grandes grupos: a cromatografia em fase normal é aquela que é feita em um sistema onde a fase polar é mantida estacionária e a não polar a móvel e a de fase reversa, onde acontece o oposto. Consequentemente usa-se um sistema de fase normal quando se deseja separar espécies polares e de fase reversa quando se deseja separar espécies não polares, uma vez que estas têm maior afinidade pela fase estacionária. Atualmente existem vários tipos de fases estacionárias, o equilíbrio que melhor determinará a separação entre as substâncias pode ser escolhido em função da fase selecionada (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

As partes fundamentais de um cromatógrafo a líquido são: a fase móvel, um controlador de gradiente (dispensável quando se trabalha no modo isocrático); as bombas que forçarão a passagem de um fluxo da fase móvel através da fase estacionária; a coluna que contém esta fase e um detetor. Existem inúmeros detetores disponíveis no mercado como os de ultra-violeta/visível, o eletroquímico, etc. (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

O ICP-MS é uma técnica analítica multielementar rápida, precisa e exata e hábil para determinar a maioria dos elementos químicos em nível de traços. Entretanto podem ocorrer interferências moleculares e isobáricas, que necessitam correção (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

Essa técnica consiste na passagem da amostra (neste caso, o efluente da coluna cromatográfica) por um plasma, que promove a ionização de seus constituintes elementares que são direcionados a um espectrômetro de massa, onde os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) e podem ser analisados separadamente (THOMAS, 2001).

Um equipamento ICP-MS é constituído de um nebulizador com câmara de spray, responsável pela introdução da amostra sob a forma líquida, uma tocha que suporta o plasma, uma interface, um focalizador de íons, um separador de massas e um detetor de massas (THOMAS, 2001).

O plasma consiste em um gás parcialmente ionizado e condutor de eletricidade e é considerado o quarto estado da matéria. É constituído por elétrons livres e íons (positivos e negativos) em estado gasoso. No ICP o plasma de acoplamento indutivo se forma quando o gás inerte, geralmente o argônio (Ar), é introduzido tangencialmente entre 2 tubos

concêntricos de quartzo envolvidos por uma espiral ligada a uma fonte de radiofrequência que produz um campo eletromagnético capaz de manter a ionização dos átomos. Sem o aporte contínuo de energia os íons e elétrons do plasma se recombinariam formando o gás neutro. Os elétrons são acelerados pelo campo magnético induzido pela bobina e dessa maneira alcançam a energia necessária para colidirem com os átomos neutros de Ar e gerar mais elétrons, “dissipando” sua energia por todo o gás. Com isso formam-se correntes de partículas positivas e negativas que se chocam gerando calor, ou seja, o plasma é capaz de dessolvatar, vaporizar e atomizar os analitos introduzidos. Uma vez atomizados, os analitos se ionizam em maior ou menor grau em função da densidade eletrônica do plasma, da temperatura e de seus diferentes potenciais de ionização. Estes íons são transferidos para o sistema de separação/detecção de massas através de uma interface especialmente desenhada para isto. A interface deve transportar os íons de maneira eficiente e de forma inalterada, do plasma que se encontra à pressão atmosférica, até o espectrômetro de massa que opera a aproximadamente 10^{-6} Torr. Ao passar através da interface o maior número possível de íons são transferidos para o separador de massas, sendo separados em função de suas m/z . Esse separador tem como objetivo separar os íons de interesse daqueles provenientes da matriz do solvente e do argônio. O separador de massas mais utilizado é o sistema quadrupolo, constituído por 4 bastões metálicos que possuem o mesmo tamanho e o mesmo diâmetro. Em dois bastões é aplicado uma corrente contínua e aos outros dois (opostos) um campo de radiofrequência, apenas íons que possuem uma relação m/z definida podem ultrapassá-los atingindo o sistema de detecção onde são transformados em sinais elétricos. Os demais íons ficam desviados e não atingem o detetor (THOMAS, 2001).

Uma excelente descrição básica das partes essenciais que compõem um ICP-MS foi feita por Thomas(2001).

1.5. ASPECTOS LEGAIS

Recentemente o Brasil através da Anvisa publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 42 de 29 de agosto de 2013 (publicada no DO da União 168 de 30 de agosto de 2013), recomendando o mesmo valor estabelecido pelo Codex Alimentarius, ou seja, o limite máximo permissível para arroz e seus derivados o valor de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para As total ou As

inorgânico (CODEX ALIMENTARIUS, 2013). De acordo com este documento, valores tão elevados quanto $5,71 \text{ mg kg}^{-1}$ foi encontrado em amostras deste cereal.

No entanto, a análise de 44 amostras de vários tipos de arroz provenientes de diversas regiões do país, mostraram concentrações médias de As total de 222.8 ngg^{-1} com cerca de 25% das mesmas apresentando concentrações superiores aos limites recomendados pelo Codex. As formas inorgânicas e o DMA foram as espécies mais abundantes (BATISTA, B.L. et al., 2011)

Por outro lado, o As geralmente é encontrado em concentrações mais baixas no trigo (cerca de uma ordem de grandeza menor) quando comparado ao arroz mas naquele cereal predomina a forma inorgânica (até 70%). Isto leva à suspeita de que o trigo pode ser igualmente um importante contribuinte para a ingestão de As inorgânico através da dieta, quando esta é rica em seus derivados (CODEX ALIMENTARIUS, 2013; CUBADDA et al., 2010).

Recentemente alguns casos de contaminação arsenical em outros tipos de alimentos têm sido reportados. Na Holanda, a análise de 56 amostras de preparações herbáceas (chás) utilizadas na medicina chinesa, tibetana e Ayurvédica tradicionais evidenciaram que 26 (46%) apresentaram resultados muito superiores aos limites recomendados para ingestão deste elemento, constituindo-se em causa de apreensão e requerendo estrito controle de qualidade sobre estes produtos (MARTENAA et al., 2010).

Em amostras de alimentos infantis como biscoitos, cereais a base de arroz, pasta, noodles, etc a concentração de As inorgânico encontrada foi significativamente maior que nos cereais à base de trigo, expondo principalmente crianças celíacas a altos riscos. Além disso, quando a ingestão de As por crianças entre 8 e 12 meses foi calculada, mostrou-se elevada (CARBONELL-BARRACHINA et al., 2012; MEHARG et al., 2008).

Concentrações preocupantes de As também foram encontradas em carne de frangos. Neste caso é importante lembrar que o Brasil é um dos principais países produtores e exportadores de frangos do mundo e que o consumo interno deste alimento é também elevado.

Estudos de risco sugerem que o consumo de carne de frango contaminada por As seja responsável por um aumento de 3,7 casos de câncer na bexiga e ou pulmão por 100.000 casos de câncer nos EUA (JACKSON et al., 2012).

Naquele mercado, a análise de 116 amostras de carne de frango cruas e 142 de carne cozida mostraram que 65 (56%) das amostras cruas e 78 (55%) das cozidas apresentaram As total $\geq 10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso seco (NACHMAN et al., 2013; SCHMIDT, 2013).

Este problema parece não estar circunscrito apenas aos EUA. No Brasil, também há registro de concentrações elevadas de As em amostras de ração para aves, que podem estar associados ao uso de estimulante à base de As adicionados à ração em concentrações que podem variar 22,7 até 45,4g ton⁻¹. Nestes casos a concentração de As total nas amostras de “leito de frango” provenientes de granjas de criação de galinhas situou-se entre 1,30 a 29,8 mgkg⁻¹ (DIONÍSIO, GONZALEZ, NÓBREGA, 2011).

1.6. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O final do século XIX trouxe significativas mudanças para saúde pública no país que impulsionou a ampliação das atribuições da vigilância sanitária (EDUARDO E MIRANDA, 1998).

No final dos anos 70, o então presidente Ernesto Geisel, promoveu uma reforma administrativa com uma ampla repercussão na área da Vigilância Sanitária (Visa). O Ministério da Saúde passou por uma reestruturação e foi criada a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) que tinha como finalidade promover, elaborar e controlar a aplicação e fiscalizar o cumprimento de normas e padrão de interesse sanitário (BUENO, 2005).

A Constituição Federal, promulgada em 1988, tornou-se um importante instrumento legislativo na área da saúde e Visa uma vez que reconheceu a saúde como um direito universal. O Estado tornou-se responsável pela garantia à saúde e pelas ações de vigilância sanitária. O artigo 200 da constituição estabeleceu as atribuições do sistema único de saúde (SUS) com ações de Visa entre outras (BUENO, 2005).

Os anos noventa trouxeram significativas mudanças cujos reflexos permitiram a política de Visa que temos atualmente. Em 1990 foi promulgada a Lei 8080 incluindo a Visa como atribuição do SUS e conferindo a SNVS a coordenação da rede nacional de laboratórios de qualidade em saúde. (BUENO, 2005).

Em 1999, o Ministério da Reforma do Estado em um momento político de criação de agências reguladoras, criou a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) cuja competência envolve, dentre outras: coordenar o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária; estabelecer normas e padrões sobre limites de contaminantes, resíduos tóxicos,

desinfetantes, metais pesados e outros que envolvam risco à saúde; regulamentar, controlar e fiscalizar produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública.

Define-se como bens e produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária os medicamentos de uso humano, suas substâncias ativas e demais insumos, processos e tecnologias; os alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários; os cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes; os saneantes destinados à higienização, desinfecção ou desinfestação em ambientes domiciliares, hospitalares e coletivos e outros (BRASIL, 2014).

Cumprindo sua finalidade, a ANVISA possui programas de controle e monitoramento de alimentos, um deles é chamado de PROMAC - Programa Nacional de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em alimentos expostos ao consumo humano, cujos objetivos são: avaliar a exposição a esses aditivos e contaminantes, subsidiar a revisão e estabelecimento de limites máximos, sugerir medidas de gerenciamento de riscos. O As é inserido como um dos contaminantes monitorados pelo PROMAC (BRASIL, 2012)

Organizada em um sistema de rede, a ANVISA integra-se a algumas organizações, entre elas, as Vigilâncias Sanitárias estaduais e municipais, os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) e o INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (LOPES, 2008).

Atualmente vinculado à Fundação Oswaldo Cruz, o INCQS foi criado para substituir o antigo Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA), e tem por missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária (BRASIL, 2012 a).

O INCQS operacionaliza suas ações dentro de um contexto matricial, composto por cinco departamentos técnico-científicos: Química (DQ), Microbiologia (DM), Imunologia (DI), Farmacologia e Toxicologia (DFT) e um de Apoio aos Programas de Saúde (DAPS). Todos são integrados entre si por dez Grupos Técnicos que perpassam todas as áreas de atuação do Instituto, um destes é o Grupo Técnico de Alimentos. (BRASIL, 2012 b).

Como um dos Laboratórios de maior representatividade e excelência no país na sua área de atuação, o Instituto mantém cursos de pós-graduação para atender a área de Vigilância Sanitária, formando e qualificando profissionais para funções especializadas relacionadas ao controle da qualidade e seus impactos sobre a saúde da população.

1.7. JUSTIFICATIVA

A característica ubíqua do As, sua utilização como pesticida e seus afloramentos, constituem importante fontes de contaminação ambiental. Isso gerou uma preocupação em relação à contaminação dos alimentos principalmente oriundos de cultivos alagados, onde as condições ambientais maximiza a absorção deste elemento.

Contudo quando se trata de toxicidade é necessário vislumbrar a diferença entre as espécies químicas, suas concentrações e características toxicológicas próprias.

A ingestão de As pelo homem é fundamentalmente devido ao consumo de alimentos de origem marinha. Esses alimentos contêm elevadas concentrações de As orgânico (de 2 a 60 ngg^{-1} de peso seco) de baixa toxicidade, enquanto as concentrações das formas inorgânicas, mais tóxicas, variam de <1 a 2 ngg^{-1} . Esses valores são bastante inferiores àqueles determinados em alguns alimentos de origem terrestre, principalmente o arroz e seus produtos (0,1 a 0,4 mgkg^{-1} peso seco) de modo que a contribuição destes alimentos para a ingesta não pode ser desprezada especialmente dos alimentos processados pois nestes casos a especiação química do As pode ser alterada quando comparada ao produto “in natura” (SCHOOFF et al. 1999; EFSA, 2009.)

Estima-se que populações onde o arroz é um componente básico da alimentação estejam expostas a concentrações de As inorgânico em torno de 1 μgkg^{-1} de peso corpóreo diariamente. Entretanto para crianças abaixo de 3 anos de idade esta exposição eleva-se para valores entre 0,5 e 2,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo devido a ingestão de produtos derivados do arroz. (EFSA, 2009)

O mesmo pode estar relacionado a grupos que por motivo de saúde ou de preferência fazem uso diário de alimentos “sem glúten” onde o trigo é substituído pelo arroz.

O Comitê de Contaminantes em Alimentos do Codex Alimentarius, um Programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), do qual o Brasil faz parte, em sua reunião de Março de 2012 recomendou que o limite máximo de As em arroz deveria ser de 0,3 mgkg^{-1} para As total ou As inorgânico, ou de 0,2 mg kg^{-1} para As inorgânico arroz polido. Recomenda ainda que se determine a concentração de As inorgânico quando a concentração de As total for superior a 0,3 mg kg^{-1} (CODEX ALIMENTARIUS, 2013).

Estudo realizado no Brasil apresenta resultados obtidos na análise de 44 amostras de vários tipos de arroz provenientes de diversas regiões do País, mostrando concentrações

médias de As total de $222,8 \text{ ngg}^{-1}$, dessas 25% superiores aos limites recomendados pelo Codex. As formas inorgânicas e o DMA foram as espécies mais concentradas. Esses valores mostram que parte da população brasileira pode estar exposta através da ingestão de arroz ou de seus produtos, a concentrações de risco. (BATISTA et al, 2011)

Este mesmo documento do Codex relata que em 2012 o Brasil realizava apenas a determinação de As total por ICP-MS, ou espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, não fazendo a medida de As inorgânico em seus alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2013).

Assim, torna-se imperioso aprofundar o conhecimento sobre a especificação química do As nos alimentos disponíveis no mercado.

Para isto, neste trabalho foi avaliado um método analítico para a determinação de As total e de sua especificação química em alimentos tendo como base os equipamentos disponíveis no INCQS e realizada uma avaliação preliminar dos alimentos sem glúten disponíveis no mercado e consumidos por grupos mais suscetíveis.

Espera-se assim conhecer-se as vantagens e limitações de tais metodologias nos trabalhos de vigilância sanitária e no estabelecimento de limites seguros para a ingestão desse elemento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração de As e sua especiação química em produtos alimentícios sem glúten, a base de farinha de arroz.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o desempenho do método proposto para a determinação das concentrações de As total e sua especiação em produtos derivados do arroz;
- Determinar a concentração de As total e sua especiação química em produtos (sem glúten) adquiridos nos mercados brasileiro e espanhol;
- Avaliar o grau de interferência matricial na especiação química do As em produtos derivados do arroz .
- Comparar as concentrações de As nos produtos comercializados na Espanha e no Brasil.
- Identificar as amostras que não atendem aos requisitos estabelecidos pelas autoridades competentes quanto ao limite máximo de As permitido para consumo humano diário.

3. EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento Analítico (LaDA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) onde foi realizado o tratamento preliminar das amostras, o Laboratório de Absorção Atômica (LAAtom) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) onde foram realizadas as determinações de As total e o Laboratório de Espectrometria de Massa da Universidad del País Vasco (UPV), Espanha, onde foram realizadas determinações de As total e sua especiação.

Toda a vidraria utilizada na determinação de As total no Brasil era volumétrica, aferida e foi previamente descontaminada por tratamento com solução de Extran a 5% (24 horas de contato) e posteriormente com solução diluída de ácido nítrico a 1% (48 horas de contato) seguida de lavagem com água ultra pura. No caso das análises realizadas na Espanha (As total e especiação) foram utilizados materiais plásticos descartáveis. Isto porque materiais vítreos podem causar interferências nas análises por ICP-MS devido a elevada sensibilidade analítica dessa técnica e a possibilidade de lixiviação de íons metálicos presentes na matriz (vidro) principalmente por soluções ácidas. Por isto, sempre que possível deve-se preferir material de plástico (por exemplo, Teflon) tanto para o tratamento quanto para a estocagem das soluções-amostra.

Na Espanha a água utilizada nas análises foi obtida de um sistema de ultrapurificação Milli-Q®, modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) e no Brasil, de um ultrapurificador de água master system (Gehaka - São Paulo, Brasil).

O ácido nítrico utilizado para a digestão das amostras, foi purificado através do sistema de destilação “Sub-Boiling” (Savillex, Minnetonka, USA).

O teor de umidade foi determinado em todas as amostras sólidas de acordo com a metodologia descrita no manual Análises de materiais biológicos da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, 2014).

Todas as amostras foram adquiridas no comércio do Brasil e da Espanha, a relação dessas, de seus ingredientes e dos materiais de referência certificados é mostrada na Tabela 1.

Tabela .1 – Relação das amostras, seus ingredientes e materiais de referência certificados utilizados nesse estudo e suas origens.

Numeração das amostras	Lista de ingredientes	Descrição	Quantidade de Gordura	Local de coleta
1	Arroz.	Farinha de arroz A	0g em 30g	RJ - Brasil
2	Amido de milho, açúcar cristal, margarina vegetal, farinha de arroz, banana (polpa de fruta natural), farinha de milho, ovo integral, farinha de feijão branco, canela em pó, sal, fermentos químicos (pirofosfato de sódio e bicarbonato de sódio).	Biscoito doce banana com canela	5g em 30g	RJ - Brasil
3	Farinha de arroz integral, açúcar mascavo, óleos vegetais (palma e milho), farinha de milho integral, fécula de mandioca, extrato de soja, mel, flocos de laranja, maltodextrina, canelas em pó, agentes de crescimento (fosfato monocalcico, bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônio), estabilizante natural de soja e aromas.	Cookie laranja com mel	5g em 30g	RJ - Brasil
4	Farinha de arroz integral, farinha de soja integral, proteína de soja, açúcar cristal, açúcar mascavo, óleo de soja, ovos, gotas de chocolate meio amargo, bicarbonato de sódio bicarbonato de amônio, aroma natural de baunilha.	Cookie gotas de chocolate	2,6g em 17g	RJ - Brasil
5	Farinha de arroz, amido de milho, fécula de batata fécula de mandioca, coco ralado, açúcar cristal, ovo, gordura de palma, melado, açúcar mascavo, bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônio, sal.	Biscoito com coco	6g em 28g	RJ - Brasil
6	Farinha de arroz, amido de milho, açúcar mascavo, fécula de batata, açúcar cristal, gordura de palma, melado, farinha de soja, ovo	Cookie integral com maracujá	4g em 14g	RJ - Brasil

	desidratado, bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônia, sal, aroma idêntico ao natural de maracujá.			
7	Amido de milho, Farinha de arroz, fécula de mandioca, fécula de batata, gordura de palma, ovo desidratado, açúcar, fermento químico, bicarbonato de sódio, sal e aroma idêntico ao natural de laranja.	Bolacha com chocolate	2g em 30g	RJ - Brasil
8	Farinha de arroz, farinha de soja integral, óleos vegetais, sal light, aroma natural de ervas.	Snack de soja ervas finas	2,4g em 25g	RJ - Brasil
9	Polvilho azedo, óleo de palma, ovo, farinha de arroz integral, extrato de soja, água, sal, beta glucano.	Biscoito de polvilho	3,1g em 35g	RJ - Brasil
10	Farinha de arroz, Farinha de soja integral, óleos vegetais, sal light e aroma natural de ervas.	Salgadinho torrado	0g em 30g	RJ - Brasil
11	Arroz, açúcar, glicose.	Flocos de arroz caramelizado	0g em 25g	RJ - Brasil
12	Flocos de arroz, castanha do Pará, amêndoas, uva passa, quinoa, semente de linhaça, gergilim, mel, estabilizante natural lecitina de soja, óleo de girassol, glicose de milho, antiemectante, bicarbonato de sódio.	Barra de cereal	8,5g em 35g	RJ - Brasil
13	Farinha de arroz.	Massa alimentícia	0,7g em 70g	RJ - Brasil
14	Água, arroz italiano, óleo de girassol, óleo de cártamo, sal não iodado.	Bebida vegetal	2,7g em 200ml	RJ - Brasil
15	Farinha de arroz	CRM NIST 1568 A **	n.a	n.a
16	Farinha de arroz	CRM NIST 1568	n.a	n.a
20	Farinha de arroz integral	CRM NIES 10 B	n.a	n.a
21	Farinha de arroz integral	CRM NIES 10 C	n.a	n.a
22	Arroz	Farinha de arroz B	0g em 30g	RJ - Brasil
23	Arroz	Farinha de arroz C	0,7g em 50g	RJ - Brasil

24	Farinha de arroz, farinha de milho, açúcar, sal.	Tostas crocantes	1,7g em 100g	PV- Espanha
25	Arroz (98,7%), sementes de Sésamo e sal	Tostitas de arroz	3,6g em 100g	PV- Espanha
26	Farinha de milho, óleo vegetal, (girassol alto oleico) 18%, açúcar, fécula de milho, xarope de glucose e frutose de milho, farinha de arroz, farinha de soja, fibra de milho, fibra de ervilha, levedantes químicos: bicarbonatos de sódio e amônio, sal, emulsionante: lectina de soja.	Bolacha Maria	18,6g em 100g	PV- Espanha
27	Amido de milho (50%), gordura vegetal, açúcar mascavo de cana, farinha de arroz, farinha de soja, dextrina de milho, albumina de ovo, fécula de batata, açúcar liquido invertido, proteína de soja, ovo liquido pasteurizado, dextrose, fermentos (carbonato ácido de amônio e carbonato ácido de sódio) sal, estabilizador (sorbitol), espessante (goma guar), aroma, emulgente (lecitina de soja).	Biscoito infantil	17g em 120g	PV- Espanha
28	Farinha de milho, pedaços de chocolate sem açúcares 25%, (pasta de cacau, edulcorantes: maltitol, manteiga de cacau, emulsionante: lecitina de soja, aroma de baunilha), edulcorante: maltitol, fécula de milho, óleo de girassol 15%, farinha de arroz, farinha de soja, fibra vegetal, fécula de batata, levedantes químicos, bicarbonatos de sódio e amônio, sal, aromas emulsionante: lecitina de soja.	Cookie de chocolate	23,2g em 100g	PV- Espanha
29	Amido de milho (50%), cobertura de chocolate negro (30%), pasta de cacau, frutose, manteiga de cacau, cacau em pó, emulgente (lecitina de soja), óleo vegetal, açúcar mascavo de cana, farinha de arroz, farinha de soja, dextrina de milho, albumina de ovo, fécula de batata, açúcar	Bolacha parcialmente coberta de chocolate	27g em 100g	PV- Espanha

	liquido invertido, proteína de soja, ovo liquido, glicose, fermentos (carbonato ácido de amônio e carbonato ácido de sódio) sal, estabilizador (E420) espessante (E412) emulgente (lectina de soja), aroma.			
30	Farinha de arroz, emulsionante: mono- e digliceridos de ácidos graxos.	Macarrão de arroz	1,5g em 100g	PV- Espanha
31	Farinha de milho, farinha de arroz, proteína isolada de ervilha, emulsionante: mono- e digliceridos de ácidos graxos	Spaghetti	2,5g em 100g	PV- Espanha

Obs: as amostras de número 17, 18 e 19 não estão relacionadas, embora tenham sido analisadas, por falta de identificação adequada;

** - Amostra não analisada devido a problemas na abertura e quantidade insuficiente para testes posteriores

Legenda: n.a – não se aplica; R.J – Rio de Janeiro; P.V. – País Vasco

Abaixo são apresentadas, separadamente as condições próprias de cada tipo de análise.

Importante ressaltar que a amostra 14, bebida vegetal, foi liofilizada antes das análises utilizando o liofilizador Liotop, (São Carlos, São Paulo - Brasil). A amostra foi acondicionada por 24 horas numa temperatura inferior a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão inferior a 13 PA, equivalente a 0,1 mmHg, em seguida foi acondicionada por 48 horas no liofilizador.

3.1. DETERMINAÇÃO DE AS TOTAL

3.1.1. Materiais de referência e padrões

As determinações de As total realizadas no Brasil utilizaram o padrão CertiPUR® ICP multi-element standard solution IV - Merck (Darmstadt, Alemanha) e uma solução padrão Titrisol® Arsenic Standard Solution- Merck (Darmstadt, Alemanha) para preparação da curva de calibração. O elemento ródio (^{103}Rh) 3144 Rhodium Standard Solution – NIST (Gaithersburg, Maryland, USA) foi utilizado como padrão interno. Estes resultados foram utilizados como um teste de “screening” para a seleção das amostras a serem levadas para a Espanha.

As determinações de As total realizadas na Espanha utilizaram o padrão multielementar de metais Venture $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e os elementos Ítrio (^{89}Y - ISC Science $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em ácido nítrico 4%) e Irídio (^{193}Ir – ISC Science $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em solução de ácido clorídrico a 10%), como padrões internos e o samário (^{147}Sm e ^{149}Sm) para monitoramento do efeito matriz.

3.1.2. Instrumentação

Para a digestão das amostras empregou-se um forno de micro-ondas da marca Berghof, modelo speedwave four (Eningen, Alemanha).

Para as determinações do As total realizadas na PUC-RJ, foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado - ICP-MS – Agilent

Technologies, modelo 7500cx, equipado com um nebulizador concêntrico MicroMist, uma câmara de nebulização de quartzo duplo passo, do tipo Scott, refrigerada a 20°C, tocha de quartzo e cones (Sampler e Skimmer) de níquel.

Na Espanha utilizou-se um ICP-MS – Agilent Technologies, modelo 7500ce, equipado com um nebulizador concêntrico MicroMist, Glass Expansion (Melbourne Oeste, Victoria, Australia). Este tipo de nebulizador oferece um alto rendimento, boa precisão, sinal estável, desvios padrão baixos e limpeza rápida entre medidas. A tocha utilizada era do tipo Fassel, com injetor de diâmetro interno de 1,5 mm. Este tipo de tocha, com injetor de diâmetro interno inferior ao convencional (2,5 mm), se utiliza quando se introduzem solventes orgânicos ao plasma, já que reduzem a carga do plasma e melhoram a estabilidade.

3.1.3. Procedimento

Pesou-se exatamente cerca de 1,0000 g (nas análises realizadas na Espanha, 0,5000 g) das amostras que foram tratadas, em forno de micro-ondas pressurizado, com 5 mL de HNO₃ concentrado, por 10 minutos, de acordo com o método da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) 3051A (5,5 min para a temperatura atingir 175 °C e aí permanecendo por 5 min. sendo posteriormente reduzida para 50°C em 5 min e mantida por 10 min.). Nas análises realizadas na Espanha as amostras foram mantidas à temperatura de 175°C por 10 minutos. Devido ao alto teor de matéria orgânica na maioria das amostras, foi realizada uma etapa de pré-digestão, mantendo-as imersas no ácido nítrico durante uma hora antes da digestão assistida por radiação de micro-ondas. Após resfriamento, o volume dos extratos foi completado a 20,0 mL com água ultra pura. Uma alíquota dessa solução foi direcionada à determinação de metais pela técnica de Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). Os íons monitorados foram os de massa ⁷⁵As e o ¹⁰³Rh (no Brasil) e ⁷⁵As, ⁸⁹Y, ¹⁴⁷Sm, ¹⁹³Ire ¹⁴⁹Sm (na Espanha).

O uso do Y como padrão interno, por si só, já estaria adequado porque sua massa é próxima a do As mas contudo utilizou-se também o Ir que é um pouco mais estável e pode auxiliar o monitoramento do Sm. A concentração dos padrões internos foi mantida constante nas amostras e nas soluções padrões da curva analítica. Para eleger esses isótopos como padrões internos foram considerados o potencial de ionização, a abundância no ambiente e a

massa. O ideal é sempre escolher um elemento cujo potencial de ionização seja próximo a do seu analito, assim como sua massa.

O Y e o Ir foram utilizados para minimizar as interferências poliatômicas. Para cada ponto da curva de calibração a concentração do Sm seguiu o mesmo padrão de variação daquela do As. A concentração do Sm foi avaliada, em cada ponto, para verificar a presença de interferência da matriz.

Para a construção da curva analítica (curva de calibração), de As total, que compreendeu os valores de concentração entre 0,05 e 150 ngg⁻¹, foi utilizado o software ICP-MS ChemStation System G1834B, revisão B.03.02. Para tal introduziu-se no sistema a identificação dos padrões internos para cada analito bem como as concentrações reais de cada elemento (analitos e padrões).

Com a finalidade de aumentar a confiabilidade dos resultados foram realizadas diluições no material digerido para as determinações de As total realizadas na Espanha. Para cada amostra foram testadas 3 diluições diferentes optando-se sempre por aquelas nas quais o valor da concentração do Sm correspondesse mais fielmente ao valor teórico, em seguida era calculado a média destes valores afim de evidenciar a ausência de efeitos de matriz.

3.2. ESPECIAÇÃO DO As NOS ALIMENTOS

3.2.1. Materiais de referência e padrões

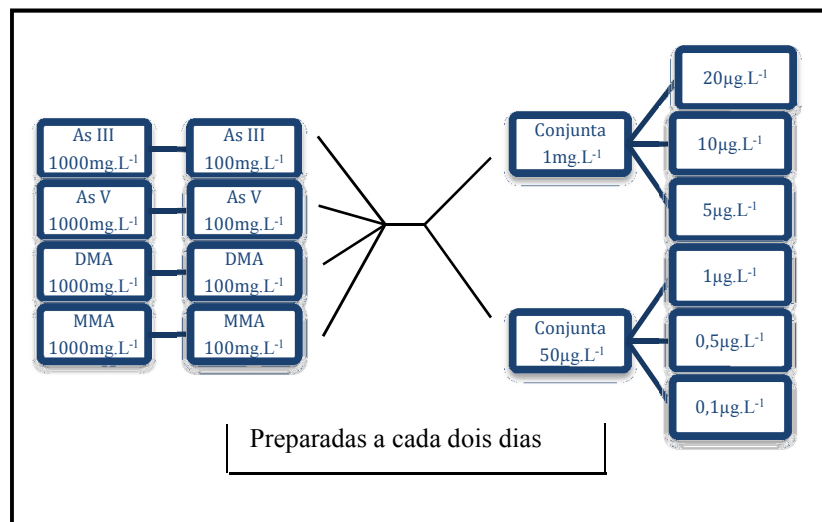
As espécies arsenicais utilizadas como padrões foram o ácido monometilarsenico (MMA)(83,3%) e o ácido dimetilarsenio (DMA) (98%) da marca Dr. Ehrenstorfer, solução padrão estoque de arsenito de sódio (As III) da Fluka e arsenatodibásico de sódio heptahidratado (As V) (>98%) da Sigma-Aldrich.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas individualmente em concentração de 1.000 mgL⁻¹ para DMA, MMA, As III e As V. A partir destas foram preparadas soluções individuais de 100 mg L⁻¹ para cada uma das espécies. Soluções conjuntas (contendo as quatro espécies) em concentrações individuais de 1mg L⁻¹ e 50 µg L⁻¹ foram obtidas, conforme esquema mostrado na Figura 7.

Para a construção das curvas analíticas foram utilizadas soluções nas concentrações de 20, 10 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtidas por diluições da solução de 1 mg L^{-1} e de 1; 0,5 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da solução de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções de 1000 mg L^{-1} foram armazenadas em congelador enquanto que as individuais de 100 mg L^{-1} e aquelas que continham todas as espécies químicas conjuntas, em geladeira. As soluções de concentrações mais baixas eram preparadas periodicamente: as de 100 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ eram refeitas a cada dois dias e diariamente uma nova curva analítica era preparada.

Figura 7: Esquema representativo das soluções utilizadas no preparo das curvas analíticas para determinação da especiação do As



O material de referência utilizado foi o SRM1568B, adquirido do NIST (Arkansas, US).

A fase móvel utilizada na separação cromatográfica consistiu de uma solução preparada com 2 mL de solução tampão-fosfato-salino (PBS) 2 mM, 2 mL de solução 0,2 mM do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA.Na_2) avolumados a 1 L. O pH foi corrigido para 6,0 com adição de uma solução de hidróxido de sódio 1 M, com o auxílio de uma micropipeta.

3.2.2. Instrumentação

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta performance – HPLC Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) hifenado a um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado - ICP-MS – Agilent Technologies, descrito acima.

O software utilizado, ICP-MS ChemStation System G1834B, é a revisão B.03.02. Os sinais cromatográficos foram integrados utilizando o software para cromatografia da Agilent Technologies (Agilent Technologies ICP-MS Plasma Chromatographic Software).

O cromatógrafo utilizado era constituído por uma bomba isocrática série 1100 e uma válvula de injeção Rheodyne modelo 7725i (Cotati, CA, USA) com loop de injeção de 100 µL. Uma coluna cromatográfica de resina de troca aniônica Agilent (15- cm de comprimento, 4,6-mm de diâmetro) foi utilizada como fase estacionária. A saída da coluna foi conectada a câmara de nebulização do ICP-MS utilizando um tubo capilar PEEK de 22 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

3.2.3. Procedimento

Todas as amostras foram trituradas, exceto a amostra líquida, e submetidas à extração prévia. Foram testadas duas soluções extratoras, solução de ácido nítrico 1% e água levemente acidificada com ácido nítrico, de acordo com HUANG(2012), NARUKAWA e colaboradores (2008).

Para isto, uma massa de 0,5000g da amostra foi tomada, transferida para os tubos do sistema de micro-ondas (MARSXpress 5 Microwave Accelerated reaction system) e adicionado um volume de 8ml de solução extratora (água ou ácido), sendo todo este processo controlado por gravimetria (Ohaus Pioneer PA214 Analytical Balance) e os dados digitados em uma planilha Excel previamente programada para o controle do processo.

Após ser submetido ao programa de aquecimento mostrado na tabela 2, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e transferida para tubos de polipropileno do tipo falcon de 50mL de capacidade, os quais seguiram para a etapa de centrifugação em centrifuga Allegra X-22R Beckman Coulter a 10.000 rpm por 10 min. Foi observado que para algumas amostras, obtinha-se um volume menor do que o adicionado. Este volume foi coletado,

pesado e utilizado nos cálculos de concentração. Em seguida, uma alíquota de 1mL foi transferida para tubos do tipo Eppendorf com capacidade de 1,5mL e então realizada a centrifugação em uma centrífuga 5415R Eppendorf a 13.000rpm a 5min.

Algumas amostras apresentavam-se turvas mesmo após a centrifugação e foram filtradas com auxílio de seringas, em filtros de fluoreto de polivinilideno de 0,45 µm (25mm Ø, Olimpeak, Teknokroma) para então seus sobrenadantes serem analisados.

A programação utilizada para extração assistida por radiação de micro-ondas é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Programação utilizada para a extração das formas arsenicais em alimentos assistida por radiação de micro-ondas.

Programação Temperatura	
Recipiente	Xpress
Amostra	Organica
Potência	800W
Rampa de temperatura	linear; 16°C por min até 80°C por 30min

As espécies arsenicais foram determinadas através de um sistema HPLC-ICP-MS utilizando uma coluna de troca aniônica. As condições instrumentais e de separação estão mostradas na tabela 3. A aquisição dos sinais ao longo da eluição da coluna pelo ICP-MS foi realizada no modo automático, utilizando-se 3 pontos por pico, “dwell” time de 100 ms e tempo de integração de 0,5 s por ponto e tempo de aquisição total de 810 s.

Foram preparadas soluções padrão de cada espécie arsenical individualmente, em duas concentrações distintas, para a determinação dos tempos de retenção de cada analito. Os cálculos quantitativos foram baseados nas áreas dos sinais.

A possibilidade de interferência da matriz foi acompanhada através da medida dos sinais de m/z 77 e 82. O sinal do cloro também foi monitorado para verificar-se uma possível interferência isobárica (ArCl).

Tabela 3: Condições analíticas utilizadas na determinação da especiação de As nos alimentos.

Condições Cromatográficas	
Coluna	Trocaaniônica (hydrophilic polymethacrylate) 4.6mm x 150mm Agilent. Speciation column for ICP-MS
Temperatura	25°C
Volume de injeção	100µL
Fase Móvel	2 mM PBS; 0,2 mM EDTA pH 6.0 corrigido com NaOH 1M
Fluxo da fase móvel	0,85 mL.min ⁻¹
Eluição	Isocrática
Condições ICP-MS - Fluxos	
Gás do Plasma	15 L min ⁻¹
Gás Auxiliar	1 L min ⁻¹
Gás carreador	1 L min ⁻¹
Gás de “Makeup”	1 L min ⁻¹
Vazão de nebulização	0,1 L min ⁻¹
Tempo total de análise	810 s

3.3. VERIFICAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS ANALÍTICAS

Nos trabalhos com ICP-MS é necessário ter-se cuidado com as interferências isobáricas, ou seja, aquelas que acontecem com outros elementos de mesma relação massa/carga que o analito.

Como o gás do plasma é o Ar que possui relação m/z 40, no caso de estudos com As, cuja massa é 75, deve-se monitorar possíveis interferentes de massa 35 (75 - 40), ou seja, o cloro. A presença deste elemento nas amostras ou como um possível contaminante poderá interferir no resultado final para As pois o equipamento pode estar determinando a combinação ArCl.

Para verificar se um resultado está sofrendo interferência isobárica adiciona-se quantidades crescentes do elemento a ser analisado para obter-se uma curva e verifica-se se o comportamento esperado é proporcional a quantidade de As adicionado. Em casos de interferência tem-se um desvio da linearidade nas concentrações mais elevadas.

Adicionalmente pode-se selecionar mais de um isótopo do analito e comparar-se os valores obtidos das concentrações dos diferentes isótopos. As concentrações obtidas por comparação das medidas dos diferentes isótopos devem ser as mesmas. Entretanto, como o As é um elemento monoisotópico, não há como efetuar este procedimento.

Não se deve utilizar solventes orgânicos como fase móvel na cromatografia quando acoplada a um sistema ICP-MS e por isto utilizou-se água, evitando-se problemas com o acoplamento.

Se a matriz da amostra for rica em sais dissolvidos, o plasma fica rico em elétrons e assim a ionização do analito é diminuída. As amostras salinas são mais difíceis de aspirar, nebulizar e atomizar/ionizar, dada sua maior viscosidade e/ou tensão superficial, o que reduz o sinal obtido resultando em interferências de matriz (matriciais).

Esses problemas são, em parte, contornados pelo uso de um (ou mais) padrões internos, cujo comportamento durante a análise seja semelhante ao analito(s) em questão (por exemplo Sc, Y, Ho). Deste modo, qualquer flutuação afetará igualmente a ambos (analito e P.I) o que permite a minimização da interferência. No presente estudo utilizou-se o Sm que foi adicionado à amostra em concentrações crescentes obtendo-se uma resposta linear e indicando a ausência de interferência de matriz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DO DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO

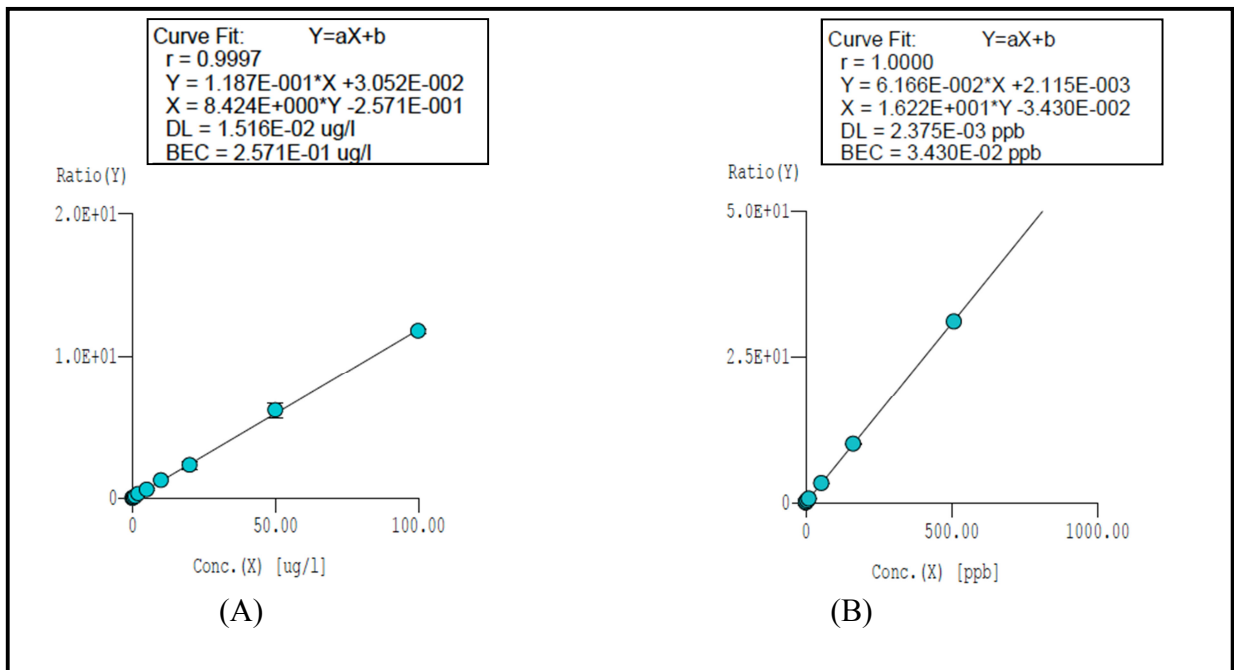
4.1.1. Curvas analíticas (ou de calibração)

Para a determinação de As total, as curvas analíticas (calibração) foram preparadas em ácido nítrico a 0,2% (no Brasil) ou em solução aproximadamente 0,02% (na Espanha) a partir das seguintes concentrações: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Brasil e 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 150,0; 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ na Espanha. Foram feitas 5 replicatas de cada ponto e 3 replicatas para cada um destes, o tempo de medida foi de 0,3s.

As condições instrumentais utilizadas estão mostradas no Apêndice 1.

A Figura 8 representa as curvas obtidas no Brasil (A) e na Espanha (B) bem como seus dados analiticamente significativos.

Figura 8 – Gráficos das curvas analíticas referentes aos ensaios de As total no Brasil (A) e na Espanha (B).



Nos estudos de especiação, foram preparadas curvas analíticas relacionando as áreas dos sinais com as concentrações para cada uma das 4 formas químicas do As, a serem determinadas: As (III); As(V); DMA e MMA. As concentrações utilizadas no preparo dessas curvas foram 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As curvas eram feitas diariamente, mostraram comportamento linear e os valores de R^2 eram iguais ou superiores (maioria) a 0,995, como desejado.

Os parâmetros estatísticos das curvas obtidas são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Exemplo dos dados estatísticos obtidos em uma das curvas de calibração obtidas na especiação do As nos alimentos.

Espécie analisada	Equação da curva	R^2
As (III)	$y = 91378x + 11812$	0,99866
As (V)	$y = 72258x - 9696,5$	0,99604
MMA	$y = 37934x + 5427,2$	0,99501
DMA	$y = 50016x + 8923,8$	0,99798

4.1.2. Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (estimado em 0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi determinado experimentalmente por medidas de soluções contendo o analito em concentrações decrescentes até que sua determinação fosse obtida com exatidão aceitável. Esta concentração foi utilizada como primeiro pontos das curvas de calibração.

Por se tratar de um trabalho de cunho totalmente quantitativo, não se preocupou com a determinação do limite de detecção, embora estes valores estimados tenham sido de 0,0156 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as análises realizadas no Brasil e 0,002375 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as análises realizadas na Espanha.

4.1.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos na análise de duas soluções padrão contendo as 4 espécies feitas no mesmo dia e em dias consecutivos. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 5

Tabela 5 - Resultados obtidos no estudo da repetitividade do método utilizado para a determinação da especiação do As em alimentos sem glúten.

	Repetitividade 0.1µg.L ⁻¹			
media	17459,50	11461,00	5952,25	10388,25
desv	899,99	946,44	245,97	487,76
cv	5,2	8,3	4,1	4,7

Para testar-se a precisão intermediária foram feitas análises de amostras idênticas em diferentes dias (Tabela 6).

Tabela 6.- Resultados obtidos no estudo da precisão intermediária do método utilizado para a determinação da especiação do As em alimentos sem glúten

	Precisão intermediária 0.1µg.L ⁻¹			
media	15710,88	10460,75	6501,56	10965,31
desv	1747,66	1057,76	563,12	671,87
cv	11,1	10,1	8,7	6,1

Estes resultados demonstram que o método possui repetitividade e precisão intermediária (dados mostrados na Tabela 7) aceitáveis para o uso analítico de rotina pois o coeficiente de variação foi menor que 11% para todas as espécies estudadas.

Adicionalmente foi realizado um estudo de recuperações sob diferentes condições de agitação na etapa de extração. Para isto, alíquotas do material de referência SRM 1568b foram pesadas e submetidas a análise pela metodologia proposta com algumas pequenas alterações

no modo de agitação (manual, vortex e agitação magnética) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Resultados obtidos na análise do CRM 1568b sob diferentes condições de agitação: A – agitação por vortex; B – agitação magnética e C – agitação manual

A	CRM vortex			teórica	recuperação
	área	conc(μgL^{-1})	conc(mgkg^{-1})		
As III	393140	3,68	0,050	0,092	97,83
DMA	759885	12,93	0,175	0,180	97,14
MMA	39366	0,96	0,013	0,012	109,60
As V	214428	2,98	0,040		

B	CRM agitação magnética			teórica	recuperação
	área	conc(μgL^{-1})	conc(mgkg^{-1})		
As III	406412	3,80	0,050	0,092	102,23
DMA	807227	13,73	0,182	0,180	101,17
MMA	34020	0,83	0,011	0,012	93,35
As V	201280	3,29	0,044		0,00

C	CRM agitação manual			teórica	recuperação
	área	conc(μgL^{-1})	conc(mgkg^{-1})		
As III	323752	3,00	0,049	0,092	105,92
DMA	655061	11,14	0,183	0,180	101,75
MMA	32205	0,79	0,013	0,012	109,78
As V	178011	2,93	0,048		

Legenda: conc - Concentração

Como pode ser observado este método é bastante robusto frente a esta variável e em qualquer das situações estudadas os resultados obtidos foram comparáveis e com excelente exatidão quando comparado aos valores certificados. É importante ressaltar que o material de referência utilizado apresentava o valor de arsênio inorgânico sem distinção de espécies, logo a taxa de recuperação foi calculada considerando as concentrações de As III e As V determinadas.

4.2. GARANTIA DA QUALIDADE DOS RESULTADOS

Para garantir a qualidade dos resultados obtidos trabalhou-se com materiais de referência do National Institute for Environmental Studies (NIES) 10B e 10C “rice flour” e do NIST, SRM 1568 e 1568b “rice flour”, que foram analisados em paralelo às amostras. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise dos materiais de referência certificados utilizados.

Materiais de referência	Concentração reportada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração média obtida ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DPR (%)	Recuperação (%)
NIST 1568	0,41 +/- 0,05	0,41	14	100
NIST 1568b	0,285 +/- 0,014	0,263	5,6	92
NIES 10b	0,11	0,112	8	1012
NIES 10c	0,15	0,153	9,5	102

Legenda: DPR - Desvio padrão relativo

Em todos os casos obtiveram-se valores superiores a 91% do valor certificado, fluando entre 92,3 e 102,4%). Os desvios-padrão foram inferiores a 10% (exceto para o CRM NIST 1568 que apresentou desvio-padrão superior a 20%). Este material de referencia teve problemas de estocagem no laboratório e quando de sua análise encontrava-se com a validade vencida, o que prejudicou a avaliação dessa anormalidade visto que pode ter influenciado o desvio-padrão encontrado.

4.3. DETERMINAÇÃO DE AS TOTAL

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos na determinação do As total em três materiais de referência certificados e nos vinte e quatro produtos avaliados.

Tabela 9. – Resultados obtidos na determinação de As total em produtos sem glúten adquiridos no comércio do Brasil e da Espanha.

	Descrição	Concentrações de As total (ng g ⁻¹)	Concentração média e desvio- padrão/ peso úmido (ng g ⁻¹)	Concentração média/peso seco (ng g ⁻¹)
Amostra 1	Farinha de arroz A	100,6/96,0/94,39	98,20 (3,33)	107,55
Amostra 2	Biscoito doce banana com canela	31,80/33,76/33,69	33,08 (1,11)	34,69
Amostra 3	Cookie laranja com mel	74,75/73,27/73,43	75,15 (2,1)	79,87
Amostra 4	Cookie gotas de chocolate	82,98/109,31/140,00	110,76 (28,54)	114,11
Amostra 5	Biscoito com coco	38,57/39,08/38,73	38,79 (0,26)	41,30
Amostra 6	Cookie integral com maracujá	43,54/38,88/38,63	40,35 (2,77)	42,78
Amostra 7	Bolacha com chocolate	32,69/38,85/34,07	35,20 (3,23)	36,89
Amostra 8	Snack de soja ervas finas	310,1/301,2/266,1	294,47 (23,26)	307,25
Amostra 9	Biscoito de polvilho	2,3/5,1/4,79	4,06 (1,53)	4,42
Amostra 10	Salgadinho torrado	73,39/74,72/73,28	73,80 (0,80)	79,56
Amostra 11	Flocos de arroz caramelizado	39,21/39,31/38,14	38,89 (0,65)	40,87
Amostra 12	Barra de cereal	80,74/ 82,18/ 82,28	81,73 (0,86)	92,04
Amostra 13	Massa alimentícia	81,28/119,2	100,24 (26,81)	114,80
Amostra 14 Brasil	Bebida vegetal	160,9/167,26/166,5	-	164,91 (3,46)
Amostra 14 Espanha	Bebida vegetal	142,8/155,14/132,3	-	143,41 (11,44)
Amostra 22	Farinha de arroz B	75,69/81,22/87,81	81,57 (6,07)	90,05
Amostra 23	Farinha de arroz C	134,5/148,75/144,2	142,48 (7,26)	161,25
Amostra 24	Tostas crocantes	87,77/84,98	86,38 (1,97)	92,52

Amostra 25	Tostitas de arroz	294,54/305,98/	300,26 (8,09)	311,60
Amostra 26	Bolacha Maria	32,05/29,18	30,62 (2,03)	31,61
Amostra 27	Biscoito infantil	39,75/38,60	39,18 (0,81)	40,81
Amostra 28	Cookie de chocolate	36,68/34,51	35,60 (1,53)	36,68
Amostra 29	Bolacha parcialmente coberta de chocolate	35,59/35,75	35,67 (0,11)	78,87
Amostra 30	Macarrão de arroz	116,69/123,48	120,09 (4,80)	136,06
Amostra 31	Spaghetti	69,11/63,14	66,13 (4,22)	75,36

* A concentração em peso seco foi calculada a partir dos valores de peso úmido corrigidos pelos teores de umidade, cujos valores são mostrados no Apêndice 2.

** A amostra 14 não apresenta cálculo de concentração de peso úmido pois foi liofilizada antes das análises

As amostras de número 16, 20, 21 e 32 correspondiam aos materiais certificados utilizados (CRM 1568; CRM NIES 10b; CRM NIES 10c e CRM 1568 b, respectivamente). As concentrações encontradas já foram mencionadas anteriormente (Tabela 8)

Como pode ser observado na Tabela 9, apenas 2 amostras apresentaram resultados superiores mas bem próximos ao limite recomendado pelas legislações internacional e brasileira ($<300 \text{ mg kg}^{-1}$). Um desses produtos foi adquirido no mercado brasileiro (Snack de soja ervas finas) e outro no mercado europeu (Tostitas de arroz).

4.4. DETERMINAÇÃO DA ESPECIAÇÃO DO As

Os resultados finais obtidos na especificação do As nos alimentos estudados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados obtidos na especiação do As nos alimentos sem glúten selecionados (média de 2 determinações).

	Descrição	As (III) ngg ⁻¹	DMA ngg ⁻¹	MMA ngg ⁻¹	As (V) ngg ⁻¹	Σ ngg ⁻¹	% em relação ao As total
NIST 1568 B (*)		46,0	164,0	13,0	34,0	257,0	97,7
Amostra 1	Farinha de arroz A	21,5	34,0	2,0	3,0	60,5	61,6
Amostra 4	Cookie gotas de chocolate	5,0	44,0	8,0	27,5	84,5	76,3
Amostra 8	Snack de soja ervas finas	6,0	24,0	-	9,0	39,0	13,2
Amostra 10	Salgadinho torrado						
Amostra 12	Barra de cereal	12,5	26,0	-	12,0	50,5	61,7
Amostra 14	Bebida vegetal	65,5	45,0	-	24,5	135,0	94,1
Amostra 22	Farinha de arroz B	28,0	22,0	-	8,0	58,0	71,1
Amostra 23	Farinha de arroz C	24,5	48,5	-	4,0	77,0	54,0
Amostra 24	Tostas crochantes	28,5	27,0		10,5	76,0	88,0
Amostra 25	Tostitas de arroz	42,0	11,0		25,0	78,0	26,0
Amostra 26	Bolacha Maria	4,0	5,0	-	5,5	14,5	47,4
Amostra 27	Biscoito infantil	6,5	8,5	-	5,5	20,5	51,5
Amostra 28	Cookie de chocolate	4,0	7,0	-	10,0	21,0	59,0
Amostra 29	Bolacha parcialmente coberta de chocolate	7,0	10,5	-	6,0	23,5	66,0

Amostra 30	Macarrão de arroz	54,0	46,0	-	8,0	108,0	90,0
Amostra 31	Spaghetti	22,0	38,0	-	22,0	82,0	124,0

* - Os valores certificados para este CRM são, expressos em mg kg⁻¹: DMA – 0,180 +/- 0,012; MMA – 0,016 +/- 0,0035; As inorgânico 0,092 +/- 0,010. Os resultados mostrados nessa tabela são aqueles obtidos quando o mesmo foi analisado em conjunto com as demais amostras, ou seja, DMA - 0,164; MMA – 0,013; As inorgânico [As (III) + As (V)] – 0,080

Estes valores mostram que o método utilizado pode produzir resultados satisfatórios dentro dos limites de aceitabilidade (variação de até 20% para baixas concentrações) para a análise de farinha de arroz e alguns produtos de composição simples.

Entretanto quando se compara os resultados do somatório das frações obtidas na especiação com aqueles obtidos na determinação de As total, algumas amostras, principalmente aquelas que possuem composição complexa, verifica-se a existência de interferência de outros componentes sobre o processo. De fato, alterações significativas na qualidade do extrato obtido, como por exemplo, algumas amostras apresentaram a existência de 3 fases, emulsões ou fases turvas, etc. Outro fator importante foi a quantidade de fase aquosa retida em algumas amostras como, por exemplo os macarrões. Nas análises desses produtos, adicionou-se 8 ml da fase aquosa extratora obtendo-se no final do processo apenas 2 ml, ficando os demais retidos na matriz.

As amostras de número 8 e 25 apresentaram os maiores valores de concentração de As total e os menores percentuais quando estas concentrações eram comparadas ao somatório das espécies. Isto mostra que maiores estudos devem ser realizados para se compreender este comportamento.

Os extratos foram submetidos somente a tratamentos físicos suaves, como a filtração e a centrifugação e para que não houvesse inter-conversão de espécies, o que alteraria a especiação natural.

Uma das possibilidades químicas da ocorrência desta baixa correlação pode ser a extração conjunta de macromoléculas que podem interagir com a fase estacionária utilizada (troca iônica) prejudicando o processo cromatográfico.

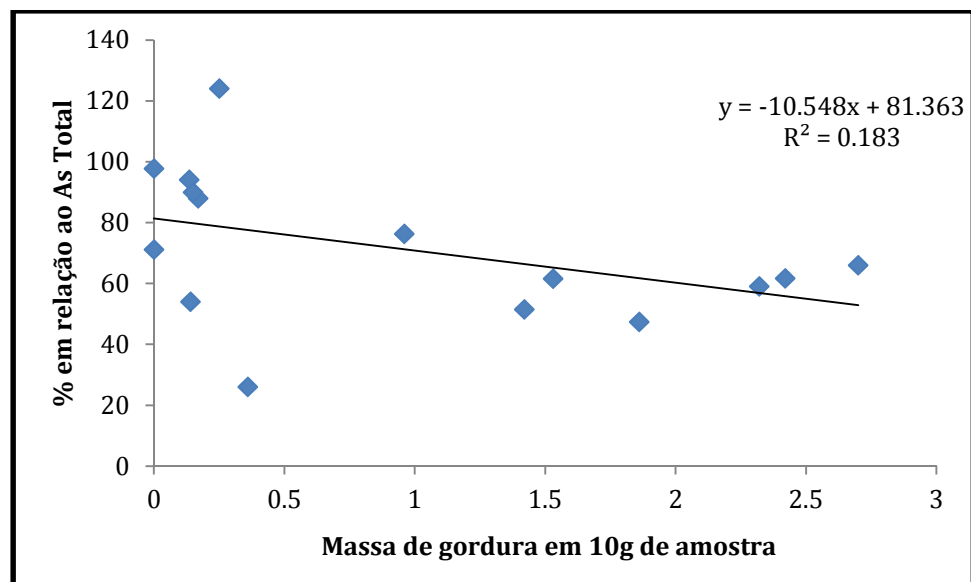
Foram analisadas 7 amostras de farinha de arroz; 4 materiais de referência e 3 amostras adquiridas no mercado. Todos os resultados obtidos nas análises dos materiais de referência foram satisfatórios tanto para As total quanto para sua especiação. Entretanto

quando os resultados de As total foram comparados ao somatório das formas determinadas nas farinhas adquiridas no mercado, os valores obtidos não foram coincidentes. Os resultados dos somatórios das formas arsenicais determinadas ficaram entre 54 e 71% do valor da concentração do As total. Estas diferenças podem ser resultantes da variabilidade da matriz devida a diferenças entre os tipos de arroz utilizados na produção das farinhas bem como a existência de outras formas arsenicais não avaliadas nesse estudo e não computadas no cálculo do somatório das frações.

A influência de outros componentes das amostras foi avaliada considerando as quantidades especificadas pelos fabricantes e usadas em testes de correlação. A observação de tendências permitirá o desenvolvimento de novas estratégias para a resolução destes problemas, considerando os equilíbrios existentes entre as diversas formas presentes nos alimentos.

Um exemplo está mostrado na Figura 9, que relaciona a quantidade de gordura dos alimentos analisados com a percentagem de recuperação do As (Σ das frações).

Figura 9 – Gráfico quantidade de gordura rotulada x percentagem de recuperação do As total



A partir dessa relação pode-se estimar que embora a dispersão seja grande, a quantidade de gordura pode ser um fator importante nesta recuperação.

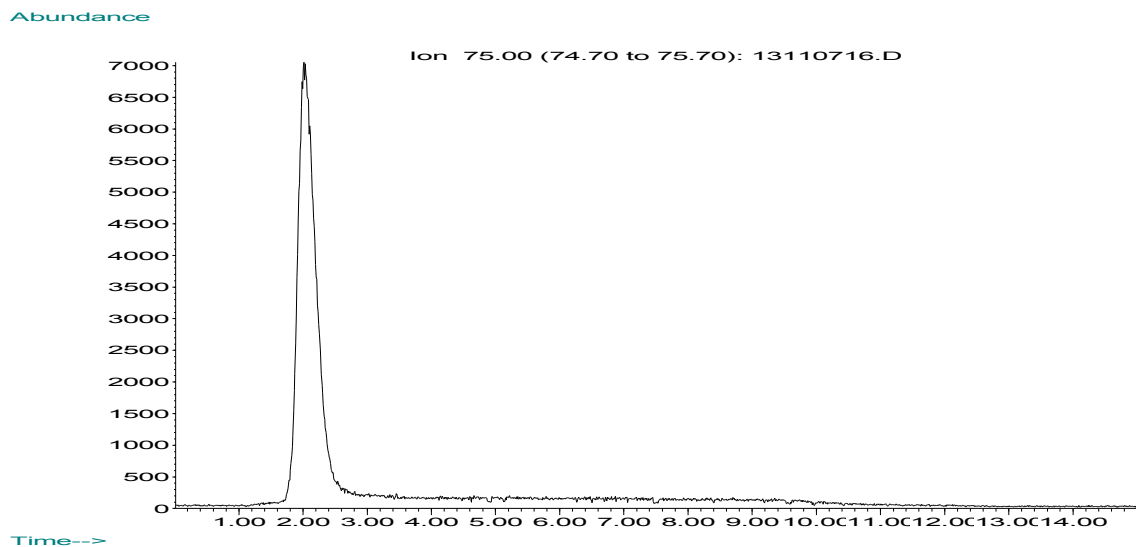
Tratamento semelhante feito para outros constituintes como carboidratos, proteínas e fibras mostraram correlações (R^2) de 0,009; 0,292 e 0,157, respectivamente, indicando que outros componentes da amostra devem ser também considerados.

4.4.1. Testes de extração ácida e aquosa assistidas por radiação de micro-ondas

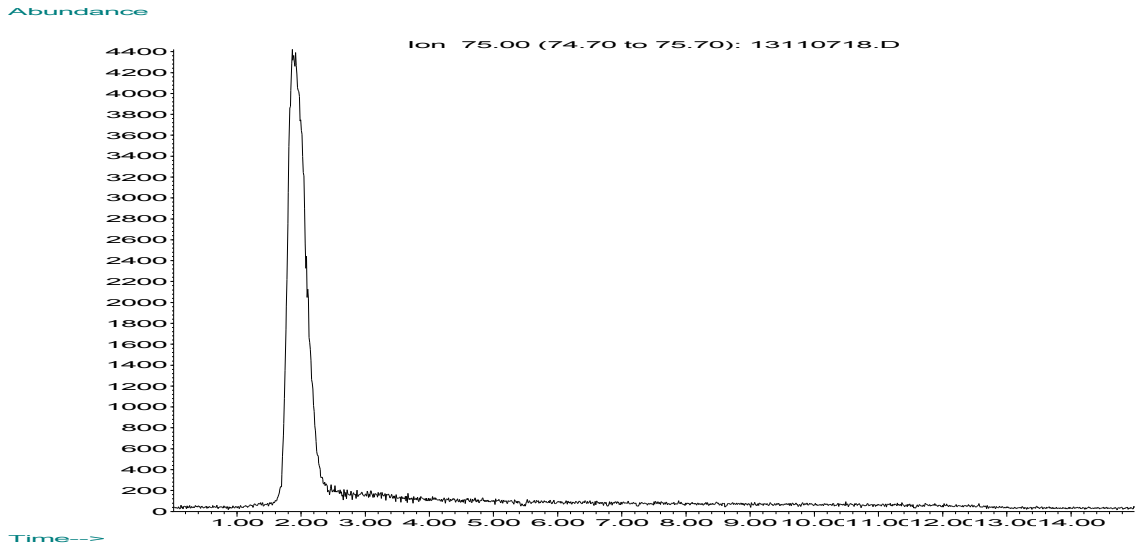
Foram testadas 3 fases líquidas para verificar-se qual seria a mais eficiente na extração das formas químicas do As presentes. Para isto foi utilizado o material de referência CRM1568b

Os resultados obtidos, mostrados na Figura 10, deixam claramente explícito que a água (solução fracamente ácida) funcionou melhor que as soluções ácidas uma vez que conseguiu extrair e preservar todas as formas químicas presentes.

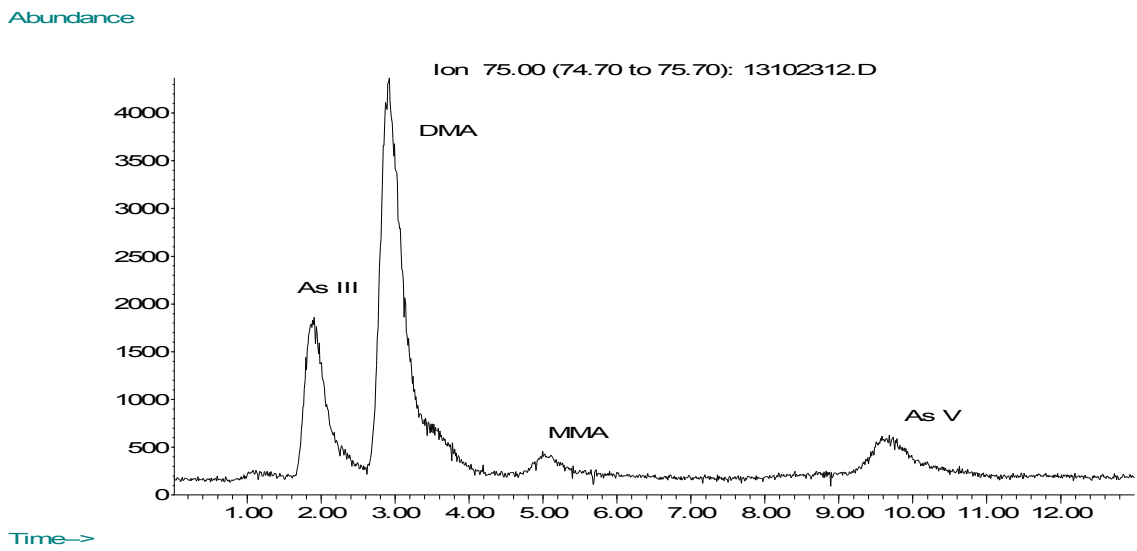
Figura 10 - Cromatogramas de extratos obtidos a partir do CRM 1568B que contém as formas As inorgânico, DMA e MMA (A e C) e da amostra de número 22 (B e D). As figuras A e B foram obtidas após extração com solução extratora de ácido nítrico a 1% e as C e D, com solução água fracamente acidulada.



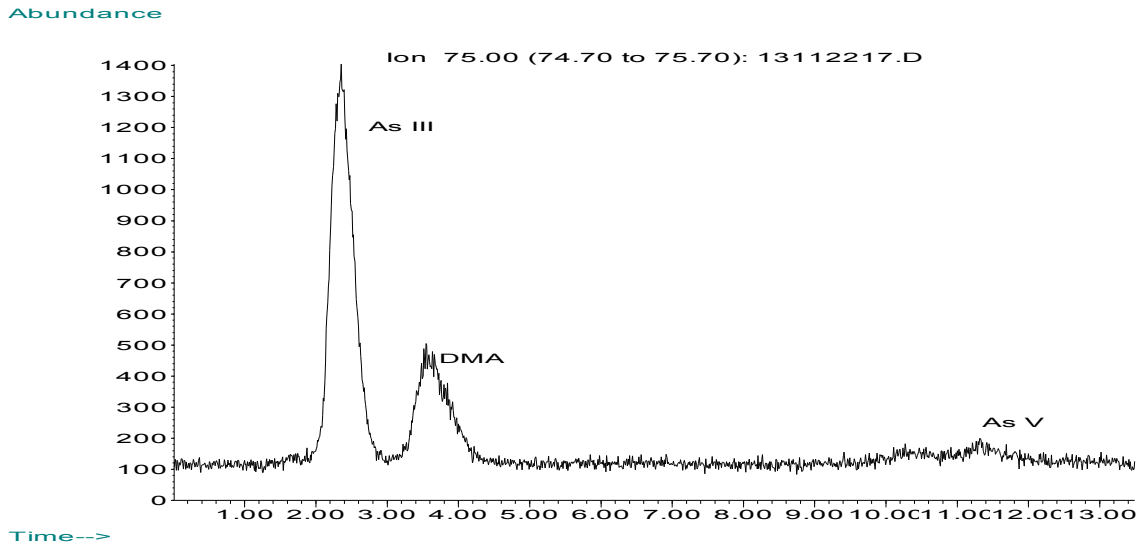
(A)



(B)



(C)



(D)

5. CONCLUSÕES

Do presente trabalho pode-se concluir:

- O método utilizado (HPLC/ICP-MS) mostrou-se adequado para a determinação de As total em farinha arroz e seus derivados e apresentou desempenho satisfatório em todos os critérios estatísticos avaliados;
- Esta metodologia pode ser facilmente implementada no INCQS uma vez que esse Instituto dispõe de toda a infraestrutura e equipamentos necessários;
- A metodologia proposta para estudos da especiação do As produziu resultados aceitáveis nas análises de farinha de arroz e mesmo de alguns produtos dele derivados de composição simples;
- A comparação dos resultados obtidos na especiação química do As em amostras de composição complexa com aqueles de As total, indicaram a existência de interferência de matriz e exige mais estudos para sua otimização.
- A concentração de As total na grande maioria das amostras analisadas (exceto em 2) encontra-se abaixo do valor máximo recomendado pelo CODEX e pela Legislação brasileira pertinente ($\leq 300 \mu\text{g g}^{-1}$). Isto sugere que não há maiores riscos à saúde associados ao consumo dos mesmos mas demonstra a necessidade de um acompanhamento através da vigilância sanitária.
- A forma mais abundante na maioria das amostras foi o As inorgânico que é aquela aceita como sua forma mais tóxica.

REFERÊNCIAS

APOSHIAN, H. V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, Arizona, v. 37, p. 397–419, april 1997.

ATSDR, Toxicological Profile for Arsenic, 2007.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; LA GUARDIA, M. Especificação de Arsênio – uma revisão. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 58 – 70, 2000.

BATISTA, B.L., SOUZA, J.M.; DE SOUZA, S.S.; BARBOSA, F.Jr. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **Journal of Hazardous Materials**, Ribeirão Preto, v. 191, n. 1-3, p. 342–348, jul. 2011.

BENRAMDANE, L.; BRESSOLLE, F.; VALLON, J.J. Arsenic Speciation in Humans and Food Products: A Review, **Journal of Chromatographic Science**, v. 37, p. 330- 44, 1999

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/PROMAC>> Acesso em: 29 de maio de 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>> Acesso em: 30 de janeiro de 2014.

BRASIL, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em: < www.fiocruz.br> Acesso em: Acesso em: 03 mai 2012a.

BUENO, E. **À sua saúde**: A vigilância sanitária na história do Brasil. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2005.

BUNDSCHUH, J.; NATH, B.; BHATTACHARYA, P.; LIU, C.W.; ARMIENTA, M.A.; MORENO LÓPEZ, M.V.; LOPEZ, D.L.; JEAN, J.S.; CORNEJO, L.; LAUER MACEDO, L.F.; FILHO, A.T. Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 92–106, jul. 2012a.

BUNDSCHUH, J.; LITTER, M.I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROSS, G.; NICOLLI, H.B.; JEAN, J.S.; LIU, C.W.; LÓPEZ, D.; ARMIENTA, M.A.; GUILHERME, L.R.G.; CUEVAS, A.G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAQUEZ, R. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries, **Science of the Total Environment**, Toowoomba, Australia, v. 429, p. 2–35, jul. 2012b.

CARABANTES, A.G.; FERNICOLA, N.A.G.G. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.4, p.365-371, 2003.

CARBONELL-BARRACHINA, A.A.; WU, X.; RAMÍREZ-GANDOLFO, A.; NORTON, G.J.; BURLÓ, F.; DEACON, C.; MEHARG, A.A. Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA. **Environmental Pollution**, Alicante, v. 163, p. 77 – 83, abr. 2012.

CERVERA, M.L. Non-chromatographic speciation. **Trends in Analytical Chemistry**, Valencia, v. 29, n. 3, p. 260 – 268, mar. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Proposed draft maximum levels for arsenic in rice. March 2012. Disponível em: < <http://www.usarice.com/doclib/188/6255.pdf>>. Acesso em: 1 out. 2013.

CUBADDA, F.; CIARDULLO, S.; D'AMATO, M.; RAGGI, A.; AURELI, F.; CARCEA, M. Arsenic Contamination of the Environment-Food Chain: A Survey on Wheat as a Test Plant To Investigate Phytoavailable Arsenic in Italian Agricultural Soils and as a Source of Inorganic Arsenic in the Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Rome, v. 58, n. 18, p. 10176–10183, ago. 2010.

D'AMATO, M., AURELI, F.; CIARDULLO, S.; RAGGI, A.; CUBADDA, F. Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound and microwave-assisted extraction and anion exchange chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Rome, v. 26, p. 207–213, 2011.

DILDA, P. J.; HOGG, P. J. Arsenical-based cancer drugs. **Cancer Treatment Reviews**, Sydney, v. 33, n. 6, p. 542– 564, out. 2007.

DIONÍSIO, A.G.G.; GONZALEZ, M.H.; NÓBREGA, J.A. Determinação de Arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Química Nova**, São Carlos, v. 34, n. 1, p. 49-52, nov. 2011.

EDUARDO, M. B. P.; MIRANDA, I. C. S. **Vigilância Sanitária**. 1. ed. São Paulo: Petrópolis, v. 1. 465 p, 1998.

ENGSTRÖM, K.S.; BROBERG, K.; CONCHA, G.; NERMELL, B.; WARHOLM, M.; VAHTER, M. Genetic Polymorphisms Influencing Arsenic Metabolism: Evidence from Argentina. **Environmental Health Perspectives**, Sweden, v. 115, n. 4, p. 599-605, jan. 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Painel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Arsenic in Food. **European Food Safety Authority Journal**, v.7, n.10, p.1-199, 2009. Disponível em: < www.efsa.europa.eu > Acesso em: 01 de novembro de 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain, Scientific Opinion on Arsenic in Food, **European Food Safety Authority Journal**. v.7, n.10, p.1351 – 550, 2009.

EVENS, A. M.; TALLMAN, M. S.; GARTENHAUS, R. B. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. **Leukemia Research**, Chicago, v. 28, n. 9, p. 891–900, set. 2004.

FAITA, F., CORI, L., BIANCHI, F.; ANDREASSI, M.G. Arsenic-Induced Genotoxicity and Genetic Susceptibility to Arsenic-Related Pathologies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Pisa, v. 10, p. 1527-1546, abr. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. (FAO/WHO). Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food additives and contaminants. **Position paper on Arsenic**, 1998.

GONTIJO, B., BITTENCOURT, F. Arsênio - Uma revisão histórica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, n.1, p.91-95, 2005.

GONZALVEZ, A.; ARMENTA, S.; CERVERA, M.L.; DE LA GUARDIA, M. Non Chromatographic speciation. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, n. 3, p.260- 268, 2010.

GORBY, M.S. Arsenic poisoning. **The Western Journal of Medicine**, v.149, p.308–315, 1988.

HUANG, J. H.; FECHER, P.; ILGEN, G.; HU, K. N.; YANG, J. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey. **Food Chemistry**, Zurich, v. 130, n. 2, p. 453–459, jan. 2012.

HUBAUX, R.; BECKER-SANTOS, D.D.; ENFIELD, K.S.S.; ROWBOTHAM, D.; LAM, S.; LAM, W.L.; MARTINEZ, V.D. Molecular features in arsenic-induced lung tumors. **Molecular Cancer**, Vancouver, v. 12, n. 20, p. 1-11, 2013.

IARC/WHO. Some metals and metallic compounds. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.23, 1998.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. **World Health Organization**, Geneva, v.84, p. 1-477, 2004.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). **Rice in Human Nutrition**. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 1993.

INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

JACKSON, B.P.; TAYLOR, V.F.; KARAGAS, M.R.; PUNSHON, T.; COTTINGHAM, K.L. Arsenic, Organic Foods, and Brown Rice Syrup. **Environmental Health Perspectives**, New Hampshire, v. 120, n. 5, p. 623–626, mai. 2012.

JAIN, C. K.; ALI, I. Arsenic occurrence, toxicity and speciation techniques. **Water Research**, Jal Vigyan Bhawan, v. 34, n. 17, p. 4304 – 4312, dez. 2000.

JAMES, W. D.; RAGHVAN, T.; GENTRY, T. J.; SHAN, G.; LOEPPERT, R.H. Arsenic speciation: HPLC followed by ICP-MS or INAA. **Journal of Radioanalytical and nuclear Chemistry**, v.278, n.2, p. 267-270, 2008.

JOLLIFFE, D.M. A history of the use of arsenicals in man. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.86, p.287–289, 1993.

JOMOVA, K.; JENISOVA, Z.; FESZTEROVA, M.; BAROS, S.; LISKA, J.; HUDECOVA, D.; RHODES, C.J.; VALKO, M. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31 p.97-107, 2011.

KELADA, S.N.; EATON, D.L.; WANG, S.S.; ROTHMAN, N.R.; KHOURY, M.J. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health. **Environmental Health Perspectives**, Seattle, v. 111, n. 8, p. 1055–1064, jun. 2003.

KITCHIN, K.T.; CONOLLY, R. Arsenic-Induced Carcinogenesis-Oxidative Stress as a Possible Mode of Action and Future Research Needs for More Biologically Based Risk Assessment. **Chemical Research in Toxicology**, North Carolina, v. 23, n. 2, p. 327–335, dez. 2010.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's **Toxicology - The Basic Science of Poisons**. 7. ed. McGraw-Hill, 2008. Cap.18, p.734.

KUMARESAN, M., RIYAZUDDIN, P. Overview of speciation chemistry of arsenic. **Current Science**, v.80, p.837-846, 2001.

LA CALLE, M. B.; EMTEBORG, H.; LINSINGER, T.P.J. Does the determination of inorganic arsenic in rice depend on the method? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 641-51, abr. 2011.

LAKIND, J.S., BARRAJ, L.; TRAN, N.; AYLWARD, L.L. Environmental Chemicals in People: Challenges in Interpreting Biomonitoring Information. **Journal of Environmental Health**, v. 70, n. 9, p. 61-69, mai. 2008.

LEVY, J.L.; STAUBER, J.L.; ADAMS, M.S.; MAHER, W.A.; KIRBY, J.K.; JOLLEY, D.F. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New South Wales, v. 24, n. 10, p. 2630–2639, out. 2005.

LI, J.H.; ROSSMAN, T.G. Inhibition of DNA Ligase activity by arsenite: A possible mechanism of its comutagenesis. **Molecular Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 1989.

LLORENTE-MIRANTES T, CALDERÓN J, CENTRICH, F, RUBIO R, KÓPEZ-SANCHEZ JF. A need for determination of arsenic species at low levels in cereal-based food and infant cereals. Validation of a method by ICP-MS, **Food Chemistry**, 147, p. 377-85, 2014.

LOFFREDO, C. A. APOSHIAN, H.V.; CEBRIAN, M.E.; YAMAUCHI, H.; SILBERGELD, E.K. Variability in human metabolism of arsenic. **Environmental Research**, Baltimore, v. 92, n. 2, p. 85–91, jun. 2003.

LOPES, C. D.; LOPES, F. F. P. **Do risco à qualidade: a vigilância sanitária nos serviços de saúde**. Brasília: Editora Anvisa, p. 74 – 89, 2008.

LUDVIGSSON, J.F.; LEFFLER, D.A.; BAI, J.C.; BIAGI, F.; FASANO, A.; GREEN, P.H.R.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; KELLY, C.P.; LEONARD, J.N.; LUNDIN, K.E.A.; MURRAY, J.A.; SANDERS, D.S.; WALKER, M.M.; ZINGONE, F., CIACCI, C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms, **Gut**, 2012.

MARTENAA, M.J.; VAN DER WIELEN, J.C.; RIETJENS, I.M.; KLERX, W.N.; DE GROOT, H.N.; KONINGS, E.J. Monitoring of mercury, arsenic, and lead in traditional Asian herbal preparations on the Dutch market and estimation of associated risks. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 02, p. 190–205, out. 2010.

MASS, M.J.; TENNANT, A.; ROOP, B.C.; CULLEN, W.R.; STYBLO, M.; THOMAS, D.J.; KLIGERMAN, A.D. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. **Chemical Research in Toxicology**, North Carolina, v. 14, n.4, p. 355–361, fev. 2001.

MCCLINTOCK, T.Y.; CHEN, Y.; BUNDSCHUH, J.; OLIVER, J.T.; NAVONI, J.; OLMOS, V.; LEPORI, E.V.; AHSAN, H.; PARVEZ, F. Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. **Science of the Total Environment**, New York, n. 429, p. 76–91, jul. 2012.

MEHARG, A.A.; SUN, G.; WILLIAMS, P.N.; ADOMAKO, E.; DEACON, C.; ZHU, Y.G.; FELDMANN, J.; RAAB, A. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. **Environmental Pollution**, Aberdeen, v. 152, n. 3, p. 746–749, abr. 2008.

MEHARG, A.A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, Aberdeen, v. 154, n. 1, p. 29–43, abr. 2002.

NACHMAN, K.E.; BARON, P.A.; RABER, G.; FRANCESCONI, K.A.; NAVAS-ACIEN, A.; LOVE, D.C. Roxarsone, Inorganic Arsenic, and Other Arsenic Species in Chicken: A U.S.-Based Market Basket Sample. **Environmental Health Perspectives**, Baltimore, v. 121, n. 7, p. 1-34, mai. 2013.

NARUKAWA, T.; INAGAKI, K.; KUROIWA, T.; CHIBA, K. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC–ICP-MS. **Talanta**, Japan, v. 77, n. 1, p. 427–432, out. 2008.

NG, J.C. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. **Environmental Chemistry**, Brisbane, v.2, n. 3, p. 146–160, 2005.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; PIRSZEL, J.; KALINOWSKA, R. SKOWROŃSKI, T. Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. **Aquatic Toxicology**, Niecała, v. 70, n. 3, p. 201–212, dez. 2004.

PETRICK, J.S.; JAGADISH, B.; MASH, E.A.; APOSHIAN, H.V. Monomethylarsonous acid (MMAIII) and arsenite: LD50 in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. **Chemical Research in Toxicology**, Arizona, v. 14, n. 6, p. 651–656, mai. 2001.

POTERA, C. Food Safety: U.S. Rice Serves Up Arsenic. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.6, 2007.

PRZYGODA, G.; FELDMANN, J.; CULLEN, W.R. The arsenic eaters from Styria: a different Picture of people who were chronically exposed to arsenic. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 457-62, mai. 2001.

RAHMAN, M.A., HASEGAWA, H. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. **Science of the Total Environment**, v.409, p.4645–4655, 2011.

RAHMAN, M.; HASEGAWA, H.; LIM, R. Bioaccumulation,biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. **Environmental Research**, v. 116, p. 118–135, 2012.

REN, X.; MCHALE, C.M.; SKIBOLA, C.F.; SMITH, A.H.; SMITH, M.T.; ZHANG, L. An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation in Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Berkeley, v. 119, n. 1, p. 11 – 19, ago. 2011.

RODRIGUES, A.S.L., MALAFAIA, G. Efeitos da exposição ao arsênio na saúde humana. **Revista Saúde.com**, v.4, n.2, p.148-159, 2008.

ROSSMAN, T.G.; KLEIN, C.B. Genetic and epigenetic effects of environmental arsenicals. **Metallomics**, New York, v. 3, p. 1135–1141, out. 2011.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.

SANZ, E.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, Madrid, v. 1097, n. 1-2, p. 1 -8, ago. 2005.

SCHMIDT, C. S. Inorganic Arsenic May Accumulate in the Meat of Treated Chickens. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 7, p. 226, 2013.

SCHOOOF, R. A.; YOST, L.J.; EICKHOFF, J.; CRECELIUS, E.A.; CRAGIN, D.W.; MEACHER, D.M.; MENZEL, D.B. A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food. **Food and Chemical Toxicology**, Bellevue, v. 37, n. 8, p. 839-846, ago. 1999.

SCHOOOF, R. A.; YOST, L. J.; EICKHOFF, J.; CRECELIUS, E. A.; CRAGIN, D. W.; MEACHER, D. M.; MENZEL, D. B. A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food. **Food and Chemical Toxicology**, Bellevue, USA, v. 37, n.8, p. 839 -846, ago. 1999.

SHARMA, V.K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environmental International**, Melbourne, v. 35, n. 4, p. 743–759, mai. 2009.

SHEPPARD, S.C. Summary of phytotoxic levels of soil arsenic. **Water Air Soil Pollut**, v.64, p.539–550, 1992.

SHI, H.; SHI, X.; LIU, K.J. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Albuquerque, v. 255, p. 67–78, 2004.

SHIBATA, Y.; MORITA, M.; FUWA, K. Review.Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. **Advances in biophysics**, n. 28, p. 31-80, 1992.

SINGH, A.P.; GOEL, R.K.; KAUR, T. Mechanisms Pertaining to Arsenic Toxicity. **Toxicology International**, India, v. 18, n. 2, p. 87–93, dez. 2011.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**
Tradução: Ignez Caracelli et al. 5ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, E., KEMPSON, I., JUHASZ, A.L., WEBER, J., SKINNER, W.M., GRÄFE, M.
Localization and specification of arsenic and trace elements in rice tissues. **Chemosphere**,
v.76, p.529-535, 2009.

STYBLO, M.; DROBNÁ, Z.; JASPERS, I.; LIN, S.; THOMAS, D.J. The role of
biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. **Environmental
Health Perspectives**, North Carolina, v. 110, n. 5, p. 767–771, out. 2002.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP.MS. **Spectroscopy**, v. 16, n. 4, p. 38-46, 2001.

TSENG, C-H. Arsenic Methylation, Urinary Arsenic Metabolites and Human Diseases:
Current Perspective. **Journal of Environmental Science and Health Part C:
Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, Taiwan, v. 25, n. 1, p. 22, mar.
2007.

TYSON, J. The determination of arsenic compounds: a critical review. **ISRN Analytical
Chemistry**, Amherst, v. 213, p. 1-24, 2013.

UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas. Manual de análise de material biológico.
UNICAMP, 2006. Disponível em:
<http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf> Acesso em: 28 de
janeiro de 2014.

VAHTER, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. **Toxicology**, Sweden, v. 181–182, p.
211–217, dez. 2002.

VENTURA-LIMA, J.; BOGO, M.R.; MONSERRAT, J. M. Arsenic toxicity in mammals and
aquatic animals: A comparative biochemical approach. **Ecotoxicology and Environmental
Safety**, Rio Grande do Sul, v. 74, n. 3, p. 211–218, mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Agriculture Organization of the United
Nations. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food additives
and contaminants. **Report of the fifth session of the Codex Committee On Contaminants in
foods**. Geneva, Switzerland, 2011.

ZHAO, F.J.; Ma, J.F.; Meharg, A.A.; McGrath, S.P. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 777–794, 2009.

ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P.; MEHARG, A.A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 61, p. 535–59, 2010.

APÊNDICE 1

Condições instrumentais utilizadas nas análises de As total realizadas na PUC-RJ

Tuning Parameters

====Plasma Condition====	==== Ion Lenses====	Q-Pole Parameters====
RF Power : 1500 W	Extract 1 : 1.3 V	AMU Gain : 130
RF Matching : 1.7 V	Extract 2 : -105 V	AMU Offset : 125
SmplDepth : 8.2 mm	Omega Bias-ce : -16 V	Axis Gain : 1.0005
Torch-H : -0.1 mm	Omega Lens-ce : 1.6 V	Axis Offset : -0.08
Torch-V : 0.2 mm	Cell Entrance : -34 V	QP Bias : -6 V
Carrier Gas : 0.86 L/min	QP Focus : 0 V	
Makeup Gas : 0.17 L/min	Cell Exit : -42 V	Detector Parameters====
Optional Gas : 0 %		Discriminator : 8 mV
Nebulizer Pump : 0.1 rps	Octopole ParametersAnalog HV : 2300 V	
Sample Pump : --- rps	OctP RF : 182 V	Pulse HV : 1700 V
S/C Temp : 2 degC	OctP Bias : -5.8 V	

====ReactionCell====

ReactionMode : OFF

APÊNDICE 2

Identificação nominal	Tipo de Amostra	Teor de massa seca (%)	Umidade (%)
NIES 1	CRM - Farinha de Arroz	87,16	12,84
NIES 2	CRM - Farinha de Arroz	87,46	12,54
NIES 10b	CRM - Farinha de Arroz	88,02	11,98
NIES 10c	CRM - Farinha de Arroz	88,12	11,88
Amostra 1	Farinha de Arroz	91,93	8,07
Amostra 2	Biscoito doce (banana e canela)	95,36	4,64
Amostra 3	Cookie de laranja e mel	94,09	5,91
Amostra 4	Cookie gotas de chocolate	97,06	2,94
Amostra 5	Biscoito com coco	93,92	6,08
Amostra 6	Biscoito integral com maracujá	94,31	5,69
Amostra 7	Bolacha de chocolate	95,41	4,59
Amostra 8	"Snack" de soja (ervas finas)	95,84	4,16
Amostra 9	Biscoito de polvilho azedo	91,80	8,20
Amostra 10	Salgadinho torrado	92,76	7,24
Amostra 11	Flocos de arroz caramelizado	95,21	4,79
Amostra 12	Barra de cereal	88,80	11,20
Amostra 13	Massa alimentícia (macarrão)	87,32	12,68
NIST 1568 a	Farinha de Arroz	89,20	10,80
NIST 1568	Farinha de Arroz	89,20	10,80
Amostra 22	Farinha de arroz B	90,58	9,42
Amostra 23	Farinha de arroz C	88,86	11,14
Amostra 24	Tostas crocantes	93,36	6,64
Amostra 25	Tostitas de arroz	96,36	3,64
Amostra 26	Bolachas Maria	96,88	3,13
Amostra 27	Biscoito infantil	96,01	3,99
Amostra 28	Cookie de chocolate	97,05	2,95
Amostra 29	Bolacha parcialmente coberta de chocolate	44,66	55,34
Amostra 30	Macarrão de arroz	88,26	11,74
Amostra 31	Spaghetti	87,74	12,26